

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

---



Oxidativní stres jako možný důsledek působení opioidů

Oxidative stress as the possible outcome of opioid  
treatment

Bakalářská práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

**Barbora Böhmová**

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2011

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2011

.....  
Barbora Böhmová

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho ochotu, pomoc a trpělivost při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a svým přátelům za užitečné rady.

## Abstrakt

Volné radikály a reaktivní formy kyslíku jsou neustále vytvářeny ve všech aerobních organismech. Mohou být zapojeny v etiologii některých nemocí, jako je rakovina, ateroskleróza, revmatoidní artritida, nemoci jater, ledvin, kardiovaskulární, neurodegenerativní onemocnění či předčasné stárnutí. Volné radikály a reaktivní formy kyslíku také mohou způsobit oxidativní poškození důležitých buněčných komponent-proteinů, lipidů a DNA. V buňkách existují antioxidační systémy, které neutralizují tyto radikály. Patří mezi ně některé vitamíny (kyselina askorbová,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten) a enzymy, např. superoxiddismutasa přeměňující superoxidový radikál na peroxid vodíku a molekulární kyslík, či katalasa odstraňující peroxid vodíku. Dalším důležitým enzymem odstraňující peroxid vodíku v lidských buňkách je glutathionperoxidasa. Při snížené aktivitě antioxidantů dochází k nadměrné produkci volných radikálů vedoucí k oxidativnímu stresu. Mezi prooxidanty (látky vyvolávající oxidativní stres) patří i opioidy. Opioidy svými účinky snižují aktivitu antioxidačních enzymů a mohou vytvářet reaktivní formy kyslíku. Cílem této práce je shromáždit poznatky týkající se potenciální schopnosti opioidů vyvolávat oxidativní stres. Jsou zde stručně shrnuty informace o opioidech, oxidativním stresu, volných radikálech a antioxidantech.

## Klíčová slova

Opioidy, oxidativní stres, reaktivní formy kyslíku, volné radikály, antioxidanty.

## Abstract

Free radicals and reactive oxygen species are continuously formed in all aerobic organisms. They may be implicated in ethiology of some diseases such as cancer, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, liver, renal, cardiovascular, and neurodegenerative diseases and premature aging. Free radicals and reactive oxygen species can also cause oxidative damage to important cellular components – proteins, lipids, and DNA. Cells are equipped with antioxidant systems to neutralize these radicals. The antioxidant system includes some vitamins (ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene) and enzymes, e.g., superoxide dismutase converting superoxide radical to hydrogen peroxide and molecular oxygen or catalase destroying  $H_2O_2$ . Another important  $H_2O_2$ -removing enzyme in human cells is glutathione peroxidase. Reduced activity of antioxidants leads to excessive production of free radicals resulting in oxidative stress. Opioids belong among pro-oxidants (chemicals inducing oxidative stress). Opioids can decrease activity of antioxidant enzymes and generate reactive oxygen species. The aim of this bachelor thesis is to gather information regarding the opioid ability to elicit oxidative stress. It briefly summarizes our current knowledge about opioids, oxidative stress, free radicals and antioxidants.

## Key words

Opioids, oxidative stress, reactive oxygen species, free radicals, antioxidants.

# Obsah

1. Seznam zkratk	7
2. Úvod	9
3. Opioidy	9
3.1. Historie	9
3.2. Klasifikace opioidů	10
3.3. Opioidní receptory	13
3.3.1. Typy opioidních receptorů	13
3.3.2. G-proteiny	14
3.4. Klinický význam opioidů	16
3.5. Opioidy a závislost	17
3.6. Tolerance	17
4. Oxidativní stres	18
4.1. Oxidativní stres	18
4.1.1. Důsledek oxidativního stresu	19
4.1.2. Oxidativní stres a nemoci	19
4.2. Volné radikály	20
4.2.1. Reaktivní formy kyslíku	20
4.2.1.1. Hydroxylový radikál	21
4.2.1.2. Superoxidový radikál	22
4.2.1.3. Peroxid vodíku	22
4.2.1.4. Singletový kyslík	23
4.2.1.5. Oxid dusnatý a peroxynitrit	23
4.2.1.6. Kyselina chlorná	24
4.3. Prooxidanty	24
4.4. Antioxidanty	24
4.4.1. Neenzymatické antioxidanty	25
4.4.1.1. Vitamin E	25
4.4.1.2. Kyselina L-askorbová (vitamín C)	26
4.4.1.3. $\beta$ -karoten	26
4.4.1.4. Kyselina močová	26
4.4.1.5. Glutathion (GSH)	27
4.4.1.6. Koenzym Q10	27
4.4.1.7. Chelátory	27
4.4.2. Enzymatické antioxidanty	28
4.4.2.1. Superoxiddismutasa (SOD)	28
4.4.2.2. Katalasa (CAT)	28
4.4.2.3. Glutathionperoxidasa (GSHPx, GPx)	28
4.4.2.4. Glutathionreduktasa (GR)	29

5. Opioidy a oxidativní stres	29
5.1. Morfinem vyvolaný oxidativní stres	29
5.1.1. Morfinem vyvolaný oxidativní stres v jaterních buňkách	30
5.1.2. Vznik ROS zprostředkovaný fosfolipasou D2	31
5.1.3. Morfin a neuroAIDS	32
5.1.4. Morfinem vyvolaná apoptóza makrofágů	32
5.2. Met-enkefalin a oxidativní stres	32
5.3. Heroinem vyvolaný oxidativní stres	33
5.4. Ochranný účinek endomorfínů proti oxidativnímu poškození	34
6. Závěr	35
7. Seznam literatury	36

## 1. Seznam zkratek

Ala	alanin
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BCNU	karmustin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAT	katalasa
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CoQ	ubichinon
DADLE	D-Ala <sup>2</sup> -Leu <sup>5</sup> -enkefalin
DAG	diacylglycerol
DOR, DOP	δ-opioidní receptor
DPI	diphenyleneiodonium chloride
FAD	flavinadenindinukleotid
GC	guanylylcyklasa
Gln	glutamin
Gly	glycin
GMP	guanosindifosfát
GPCRs	receptory spřažené s G-proteiny
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GSHPx	glutathionperoxidasa
GSSG	glutathion disulfid
GTP	guanosintrifosfát
Ile	isoleucin
IP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5- trifosfát
KOR, KOP	κ-opioidní receptor
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
Leu	leucin
Lys	lysin
MAOB	monoaminoxidasa B
Met	methionin
MOR, MOP	μ-opioidní receptor
NADH	nikotinadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
NOS	syntáza oxidu dusnatého
Phe	fenylalanin
PIP2	fosfatidylinositol-4,5- bisfosfát

PKC	proteinkinasa C
PLC	fosfolipasa C
PLD2	fosfolipasa D2
Pro	prolin
PUFAs	omega-3 polynenasycené kyseliny
ROS	reaktivní formy kyslíku
Ser	serin
SOD	superoxiddismutasa
Thr	threonin
TNF	tumor necrosis factor
Toc	tokoferol
Toc-3	tokotrienol
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin



## 2. Úvod

Opioidy jsou přirozeně se vyskytující alkaloidy získané z máku setého *Papaver somniferum*. Ovlivňují organismus prostřednictvím opioidních receptorů. V lékařství našly uplatnění jako analgetika anodyna. Pro svůj silný analgetický účinek se staly lékem první volby pro utišení intenzivní akutní či chronické bolesti po úrazech, chirurgických zákrocích a nádorové bolesti (morfin, fentanyl). Jelikož svým účinkem tlumí i kašlací reflex, používají se i jako antitusika (kodein). Pro své mnohé nežádoucí účinky, mezi které patří bolest hlavy, zvracení, nevolnost, zácpa, ale hlavně tolerance a závislost, existuje jisté zaujetí proti užívání opioidů, a to jak mezi zdravotnickým personálem, tak mezi neodbornou veřejností.

Bylo také dokázáno, že opioidy se účastní procesu zvaný oxidativní stres. Oxidativní stres nastává při nedostatečné schopnosti antioxidačních systémů neutralizovat volné radikály a reaktivní formy kyslíku. Nadměrné množství volných radikálů či reaktivních forem kyslíku vede k oxidativnímu poškození buněk, což může mít za následek řadu onemocnění. Opioidy snižují aktivitu antioxidačních enzymů a mohou vytvářet reaktivní formy kyslíku. V této práci se pokusím shrnout dosavadní poznatky o opioidech a oxidativním stresu.

## 3. Opioidy

### 3.1. Historie

Opium je nejdéle známá a používaná droga vůbec. První záznamy se datují z období mezolitu (8000 – 5000 př. n. l.). Opium je zaschlá šťáva získaná z nezralých makovic máku setého (*Papaver somniferum*). Na tobolkách nezralých makovic se udělají mělké zářezy, ze kterých vytéká lepkavá tekutina. Ta na vzduchu rychle tuhne a mění se na tmavohnědou hmotu – opium. V zaschlé šťávě makovic se nachází různé alkaloidy – morfin, noskapin (dříve narkotin), papaverin, kodein, narcein, tebain. Surové opium obsahuje nejméně 10% morfinu. Tato hodnota závisí na oblasti, kde se mák setý pěstuje.<sup>1</sup>

Opium se používalo v lékařství zejména pro své analgetické, antitusické a anti diarrhoické účinky. A bylo také zneužíváno pro účinky vyvolávající zlepšení nálady, euforii. Nejběžnější způsob podání je kouření opia. Morfin touto cestou podání rychle proniká z plic do krevního řečiště a do mozku se dostává během několika vteřin. Dalším způsobem podání je podání perorální. V tomto případě se hlavně konzumují extrakty z makovic máku setého.<sup>1</sup>

Pro své účinky bylo opium příčinou Opiové války mezi Čínou a Velkou Británií ve 40. a 50. letech 19. století. Zboží dovážené z Číny bylo pro Evropany velmi lukrativní. Hledalo se tedy něco, co by mohlo být importováno zpět do Číny. Řešení přišlo pro Británii roku 1773, kdy došlo k obsazení Bengálska. Británie tak získala monopol na indické opium. Východoindická společnost začala dovážet velké množství opia do Číny. V Číně po opiu vznikla velká poptávka, což způsobovalo Číně značné platební potíže. Čínský císař tedy zakázal dovoz opia. Došlo k zapálení skladů s opiem

a později k válce mezi Čínou a Velkou Británií. Po výhře Británie byl v Číně otevřen trh s opiem. To vedlo k obrovskému nárůstu vzniku závislosti na této droze. Roku 1946 měla Čína více než 20 milionů obyvatel závislých na opiu.<sup>2</sup>

Morfin byl poprvé izolován roku 1805 německým lékárníkem Friedrichem Sertürnerem.<sup>3</sup> Označení „morphium” pochází z řecké mytologie – Morpheus byl bůh spánku a snů. Heroin, derivát morfinu byl synteticky vytvořen roku 1898. Roku 1942, Weijlard a Erikson syntetizovali prvního antagonistu morfinu, naloxon.<sup>4</sup> Roku 1973 byly objeveny opioidní receptory a bylo dokázáno, že slouží jako receptory pro neurotransmitery – endogenní opioidy. První endogenní opioid (enkefalin) byl nalezen roku 1975.<sup>5</sup>

### 3.2. Klasifikace opioidů

Opioidy je možno rozdělit do několika skupin. Lze je klasifikovat podle jejich původu, chemické struktury či interakce s opioidními receptory.

A) Podle původu:<sup>6</sup>

- 1) Přírodní opioidy – alkaloidy získané z opia máku setého: morfin, kodein, papaverin, tebain, narkotin. Tato skupina bývá často nazývána opiáty.
- 2) Semisyntetické opioidy – heroin, oxykodon vytvořené chemickou modifikací opiátů.
- 3) Syntetické opioidy – chemické sloučeniny, které nejsou odvozené od opiátů. Jsou schopné vázat se na opioidní receptor. Příkladem syntetických opioidů je metadon, meperidin, petidin a tramadol.
- 4) Endogenní opioidy – opioidní peptidy, které se vážou na opioidní receptory a vyvolávají účinky podobné účinkům morfinu. Jsou to látky tělu vlastní.<sup>7</sup>

Zpočátku byly nalezeny v centrálním nervovém systému, později v mnoha orgánech a v periferních tkáních. Opioidní peptidy regulují v organismu různé fyziologické pochody, např. reprodukci, laktaci, emoce, respiraci, termoregulaci, procesy trávení, imunoregulační reakce, reakce na stres, reakce na bolest.<sup>8</sup>

Existují 3 hlavní třídy endogenních opioidů: endorfíny, enkefaliny a dynorfíny, které vznikají z prekurzorů pro-opiomelanokortinu, pro-enkefalinu a pro-dynorfínu. Součástí endogenního opioidního systému jsou i  $\mu$ -,  $\kappa$ - a  $\delta$ - opioidní receptory (MOR, KOR a DOR).<sup>9</sup>

$\beta$ -endorfin je endogenní ligand MOR receptorů. Má vysokou afinitu k  $\mu_1$ -receptoru, nižší k  $\mu_2$ - a  $\delta$ -receptoru. Enkefaliny mají větší selektivitu k  $\delta$ -receptorům než k  $\mu$ -receptorům a nemají žádný účinek na  $\kappa$ -receptory. Dynorfíny působí prostřednictvím  $\kappa$ -receptorů.<sup>10</sup>

Chemická struktura C-terminální části molekuly endogenního opioidu určuje afinitu tohoto opioidu k různým opioidním receptorům. Určuje i spektrum jejich účinku a stabilitu dané látky. Na N-terminální části obsahují všechny endogenní opioidy aminokyselinovou sekvenci Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (ev. Leu).<sup>11</sup>

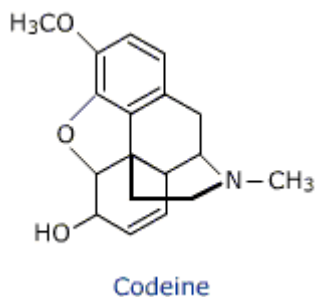
Mezi endogenní opioidy byly nedávno zařazeny i dva tetrapeptidy, Endomorfín-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) a Endomorfín-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>). Endomorfíny mají vysokou afinitu k  $\mu$ -receptorům. Endomorfíny jsou distribuovány převážně thalamem, hypotalamem, míchou a mozkovým kmenem. Hrají důležitou roli při vnímání bolesti a regulaci gastrointestinálního, respiračního a kardiovaskulárního systému.<sup>12</sup>

**Tbl. 1 Přehled endogenních opioidů (upraveno podle 8)**

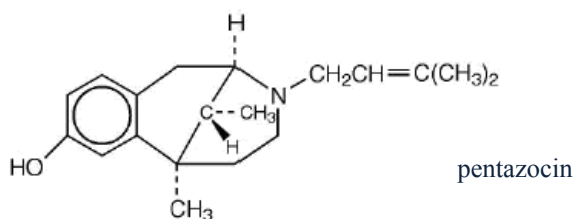
Receptor	Endogenní opioid	Prekurzor	Sekvence aminokyselin
$\mu$ (MOP, OP <sub>3</sub> )	$\beta$ -endorfin	pro-opiomelanokortin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu
	Endomorfín-1	neznámý	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>
	Endomorfín-2	neznámý	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH <sub>2</sub>
$\delta$ (DOP, OP <sub>1</sub> )	Met-enkefalin	pro-enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
	Leu-enkefalin	pro-enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
$\kappa$ (KOP, OP <sub>2</sub> )	Dynorfin A (1-17)	pro-dynorfin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
	Dynorfin B (1-13)	pro-dynorfin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr
	Dynorfin AB (1-32)	pro-dynorfin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr

B) Podle chemické struktury: <sup>13</sup>

- 1) Fenanthreny – do této skupiny patří morfin, kodein, oxykodon, hydrokodon, buprenorfin, nalbupin, butorfanol, levorfanol



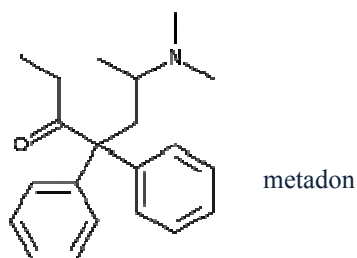
- 2) Benzomorfolany – jediný zástupce pentazocin



- 3) Fenylnpiperidiny – např. fentanyl, alfentanil, sufentanil, meperidin, petidin



- 4) Difenylnheptany – zahrnující propoxyfen a metadon



C) Podle interakce s opioidními receptory: <sup>13</sup>

- 1) Agonisté – stimulují všechny opioidní receptory, tím indukují změny v buňce, které vedou k fyziologické aktivitě. Mezi agonisty patří endogenní opioidy, morfin a většina terapeuticky používaných opiátů.

- 2) Parciální agonisté – látky, které jsou ve srovnání s čistými agonisty účinné pouze částečně. Příkladem je buprenorfin, který má vysokou afinitu, ale nízkou účinnost na  $\mu$ - receptorech.
- 3) Agonisté/antagonisté – opioidy, které mají značně heterogenní spektrum účinku. Příčinou této heterogenity je rozdílná vnitřní aktivita těchto látek na různých typech opioidních receptorů. Agonisté/antagonisté působí na jednom receptoru jako agonisté, na jiném jako antagonisté. Nejdůležitější látky této skupiny jsou pentazocin a nalbuprin.
- 4) Antagonisté – působí inhibičně na všech typech opioidních receptorů. Rozlišujeme dva typy antagonistů. Kompetitivní antagonisté soutěží o stejné vazebné místo s agonistou. Nekompetitivní antagonisté brání působení agonisty jinou cestou. Příkladem antagonisty je naloxon, kterému vnitřní aktivita zcela chybí a působí jako antidotum bez vlastního opioidního účinku.

### 3.3 Opioidní receptory

Přítomnost opioidních receptorů v centrálním nervovém systému byla popsána roku 1973.<sup>14</sup> Později byla zjištěna přítomnost těchto receptorů i v periferních tkáních, např. ve střevním epitelu, v ledvinách, nadledvinkách, plicích, varlatech, vaječnících a děloze.<sup>15</sup>

Opioidní receptory lze rozdělit do 4 skupin:  $\mu$  (mí),  $\kappa$  (kappa),  $\delta$  (delta) a nociceptin/orphanin FQ. Označení opioidních receptorů je trojího typu. Nejčastější je použití písmen z řecké abecedy:  $\mu$ ,  $\kappa$  a  $\delta$ . Další nomenklatura navržená IUPHAR (International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature) je podle jejich endogenních ligandů (opioid peptide [OP]) uspořádané chronologicky podle objevení.  $\delta$ -receptor byl označen OP<sub>1</sub>,  $\kappa$  receptor OP<sub>2</sub>,  $\mu$  receptor OP<sub>3</sub> a nociceptin/orphanin jako OP<sub>4</sub>. Třetí možností, jak pojmenovat opioidní receptor, je podle IUPHAR použitím zkratk MOP ( $\mu$ ), KOP ( $\kappa$ ), DOP ( $\delta$ ) a ORL-1 (opioid receptor-like = „podobný jako opioidní receptor“).<sup>6</sup>

#### 3.3.1. Typy opioidních receptorů<sup>16</sup>

**$\mu$  receptor (MOP, OP<sub>3</sub>)** – agonistou tohoto receptoru je morfin.  $\mu$  receptory byly objeveny především v mozковém kmeni a thalamu. Rozlišujeme dva podtypy:  $\mu_1$  a  $\mu_2$ .  $\mu_1$  receptory jsou zodpovědné za supraspinální a periferní analgezii, euforii, uklidnění a uvolnění prolaktinu.  $\mu_2$  receptory za dechovou depresi, fyzickou závislost, svědění, uvolnění růstového hormonu, bradykardii (snížení srdeční činnosti), snižují pohyblivost gastrointestinálního traktu.

**$\kappa$  receptor (KOP, OP<sub>2</sub>)** – agonistou je ketocyklazocin.  $\kappa$  receptory se nacházejí v limbickém systému, mozkovém kmeni a míše. Existují tři podtypy:  $\kappa_1$ - $\kappa_3$ . Tyto receptory zodpovídají za spinální analgezii, miózu (zúžení očních zornic) a diurézu (zabraňují uvolnění antidiuretického hormonu).

**δ receptor (DOP, OP<sub>1</sub>)** – agonistou je DADLE (D-Ala<sup>2</sup>-D-Leu<sup>5</sup>-enkefalin). δ receptory se nachází v mozku. Rozeznáváme dva podtypy: δ<sub>1</sub> a δ<sub>2</sub>. Jejich účinky nejsou dokonale prostudovány. Předpokládá se, že mohou být zodpovědné za supraspinalní a spinální analgezii, potlačení kašle a inhibici uvolnění dopaminu.

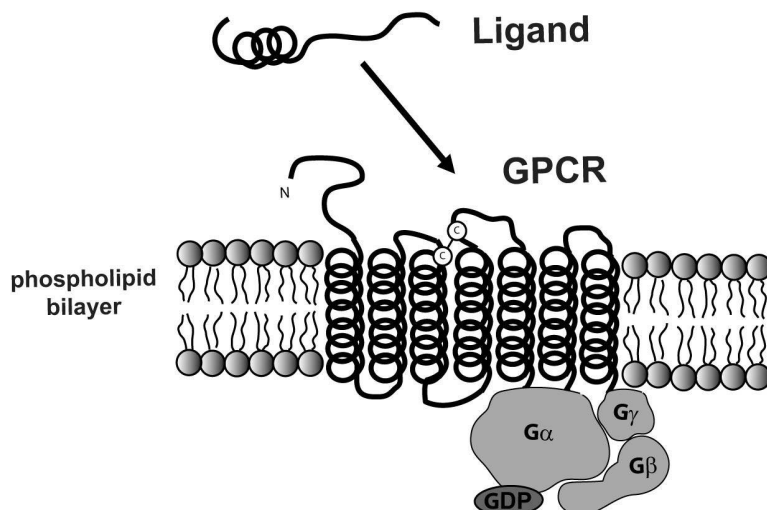
**Nociceptin/orphanin FQ receptor (ORL-1, OP<sub>4</sub>)** – tento receptor byl objeven roku 1994. Je podobný opioidním receptorům. Váže mnoho opioidních agonistů a antagonistů. Má dva endogenní ligandy – nociceptin a orphanin FQ. Klinická role tohoto receptoru nebyla zatím řádně definována. Ve farmakologických studiích však byly dokázány jeho analgetické a anxiolytické vlastnosti.<sup>17</sup>

**σ receptor** – původně byl řazen mezi opioidní receptory. Zjistilo se ale, že preferuje ligandy s pravotočivou stereochemií, nemá žádný endogenní peptid a je necitlivý k naloxonu. Nicméně účinky σ receptoru jsou důležité ve farmakologii opioidů, neboť některé z nich (dextromethorfan, pentazocin) jsou agonisty tohoto receptoru. Existují dva podtypy: σ<sub>1</sub> a σ<sub>2</sub>. σ<sub>1</sub> receptor reguluje uvolňování neurotransmiterů, jako je dopamin. Řada preklinických studií ukázala, že selektivní agonista σ<sub>1</sub> receptoru příznivě ovlivňuje některé mozkové funkce, jako je např. učení, paměť, poznání a nálada. Tyto studie naznačují, že by se v budoucnu mohli tyto selektivní agonisté využít k terapii deprese, senilní demence a k léčbě neuropsychiatrických poruch.<sup>18</sup>

### 3.3.2 G-proteiny

Opioidní receptory patří do rodiny receptorů vázajících G-proteiny (GPCRs), konkrétně do skupiny A (receptory rhodopsinového typu). Charakteristickým znakem všech GPCRs je jejich prostorové uspořádání, které je dáno přítomností sedmi hydrofobních úseků (obr. 1). Tyto úseky procházejí plasmatickou membránou ve formě transmembránových helixů, které jsou spojeny třemi extracelulárními a třemi intracelulárními hydrofilními smyčkami. Extracelulární smyčky jsou důležité pro navázání ligandu. Na intracelulární smyčky se váže trimerní G-protein. Dále tyto receptory obsahují extracelulární N-koncovou část a intracelulární C-koncovou část.<sup>19</sup>

Trimerní G-proteiny patří do skupiny proteinů s GTPázovou aktivitou. Skládají se ze tří podjednotek: α, β a γ. Navázáním agonisty na opioidní receptor dochází ke konformační změně, tedy k aktivaci receptoru. Aktivovaný receptor vytvoří vysokoafinitní komplex agonista-receptor-G-protein. Interakce aktivovaného receptoru s G-proteinem vede ke konformační změně α podjednotky. Dochází k uvolnění GDP a následnému navázání GTP. Po navázání GTP α podjednotka disociuje jak od receptoru tak od βγ dimeru. Takto setrvává, dokud není GTP hydrolyzováno vnitřní GTPázovou aktivitou α podjednotky. Poté se α podjednotka připojí k βγ dimeru.<sup>20</sup>

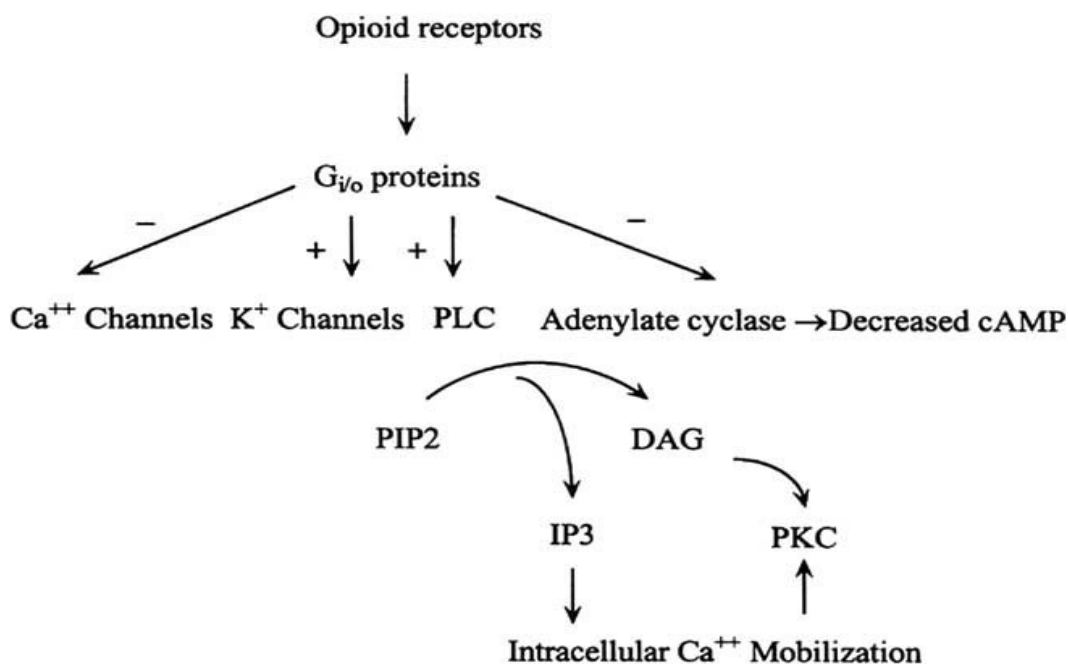


Obr. 1 Schéma GPCRs. N = extracelulární N-koncová část, C = intracelulární C-koncová část (upraveno podle cit. 21)

Opioidní receptor interaguje s pertussis toxin-senzitivním  $G_i$  nebo  $G_o$  proteinem.<sup>22</sup> Po aktivaci  $G_{i/o}$  proteinu opioidním receptorem může dojít k:<sup>23</sup>

- 1) Inhibici adenylát cyklázy – po inhibici adenylát cyklázy dochází ke snížení produkce cyklického adenosin 3, 5-monofosfátu (cAMP) v buňce. cAMP je důležitý pro vyplavení neurotransmiterů, jako je např. substance P. Substance P je neuropeptid a tzv. mediátor bolesti. Tento neuropeptid je obecně spojován s intenzivní, přetrvávající a chronickou bolestí. Je využíván k předávání zpráv o bolesti centrálnímu nervovému systému. Snížením koncentrace substance P se snižuje stimulace aferentních nociceptivních vláken a tím se zmenšuje bolest. Snížené množství substance P, histaminů a ostatních nociceptivních metabolitů rovněž pomáhá potlačit rozvoj zánětlivých otoků.<sup>24</sup>
  - 2) Aktivace fosfolipázy C (PLC) – aktivovaná PLC vytváří z fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP<sub>2</sub>) látky diacylglycerol (DAG) a inositol 1,4,5-trifosfát (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> pak uvolňuje intracelulární vápenaté ionty ( $Ca^{2+}$ ). DAG aktivuje protein kinázu C (PKC).
  - 3) Aktivace draselných ( $K^+$ ) kanálů
  - 4) Inhibice napětově-závislých  $Ca^{2+}$  kanálů
- Tyto dva poslední účinky jsou považovány za důležité pro snížení buněčné vzrušivosti a inhibici uvolnění neurotransmiterů.

Možnosti přenosu signálu od aktivovaných opioidních receptorů k buněčným efektorům jsou znázorněny na obr. 2.



Obr. 2 Schéma přenosu signálu po aktivaci opioidních receptorů. PLC = fosfolipáza C, cAMP = cyklický adenosin-3,5-monofosfát, PIP2 = fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, DAG = diacylglycerol, IP3 = inositol-1,4,5-trifosfát, PKC = protein kináza C, + aktivace, - inhibice (převzato z citace 22)

### 3.4. Klinický význam opioidů

Opioidy jsou v medicíně využívány hlavně pro svůj silný analgetický účinek.<sup>7</sup> Používají se k odstranění akutní bolesti (např. při úrazech, pooperační bolesti), dále ke zmírnění silné, chronické bolesti u nádorů, revmatoidní artritidy. K léčbě těchto bolestí se indikují silné opioidy jako je morfin, fentanyl, petidin. Fentanyl je dostupný i ve formě náplastí k transdermální aplikaci. Petidin se používá při kolikových bolestech orgánů s hladkým svalstvem (ledvinové, žlučnickové koliky).

Opioidy se také používají v anestezii. K navození neuroleptanalgezie a neuroleptanestezie se intravenózně podává fentanyl. Při epidurální anestezii se podává sufentanil, morfin.<sup>6</sup>

Opioidy také tlumí centrum pro kašel. Některé z nich se tedy používají jako antitusika (léky, které tlumí suchý a dráždivý kašel). Jako antitusika se z opioidů používá především derivát morfinu – kodein (methylmorfin). Jeho analgetický účinek je ve srovnání s morfinem nepatrný. Často se ale používá k terapii slabších nemocí hlavně v kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou či paracetamolem. Dobrý antitusický účinek má i dextromethorfan.<sup>7</sup>

Při léčbě opioidy se dostavuje i mnoho vedlejších účinků. Mezi nejčastější patří nauzea, zvracení, bolesti hlavy, závrať, ospalost, zácpa. Velkou nevýhodou některých opioidů (morfin, fentanyl) je, že vyvolávají útlum dechového centra. Již terapeutické dávky mohou zvýšit práh pro vnímání fyziologického stimulu, tj. pro parciální tlak CO<sub>2</sub>



v krvi. Míra deprese dechového centra je závislá na dávce. Vysoké dávky mohou vyvolat ochrnutí dechového centra.<sup>25</sup>

Existuje mnoho cest podání opioidů do organismu: intravenózní, intramuskulární, subkutánní, epidurální, orální, transdermální, rektální, intranasální a intratekální.<sup>26</sup>

### 3.5. Opioidy a závislost

Rozvoj závislosti na opioidech při chronickém užívání je veliký problém. Průměrně se u 2-6% pacientů, kteří užívají opioidy dlouhodobě, vyvine závislost na daný opioid. U nelegálně používaných opioidů to může být až 30%. Bylo zjištěno, že např. po jednom užití heroinu se k němu vrací 60% pacientů po 3 měsících a 75-80% po 12 měsících.<sup>27</sup>

Při dlouhodobém užívání opioidů může vzniknout psychická a fyzická závislost. Psychická závislost je duševní stav, který se projevuje neodolatelnou touhou po droze. Při fyzické závislosti se po náhlém vysazení opioidního agonisty či po podání opioidního antagonisty dostavují abstinenní příznaky. Abstinenní příznaky se nejprve projevují úzkostí, nervozitou, podrážděním, střídáním zimnice a návalů horka. Mohou být provázeny i zvýšeným sliněním, slzením, pocením a rýmou. Při vyvrcholení intenzity abstinenních příznaků se dostavuje nauzea, zvracení, křeče v dutině břišní, nespavost. Abstinenní příznaky se objevují po 6-12 hodinách a vrcholí po 24-72 hodinách od přerušení podání opioidního agonisty. Lze jim zabránit postupným snižováním dávky opioidu. Zkušenosti dokazují, že pro prevenci abstinenních příznaků stačí denní dávka, která se rovná čtvrtině předchozí denní dávky. Tato dávka se nazývá detoxikační dávka.<sup>28</sup>

### 3.6. Tolerance

Tolerance je jev, kdy opakovaným podáváním opioidu dochází postupně ke snížení jeho účinku. K dosažení původního účinku je tedy třeba vyšší dávky opioidu. Tolerance se obvykle objevuje u dlouhodobě podávaných opioidů. Může se rozvíjet na receptorové či buněčné úrovni. Tolerance může vznikat např. na úrovni regulace G-proteinů, adenylát cyklázy, neurotransmiterů (glutamát/NMDA receptor/NO).<sup>29</sup>

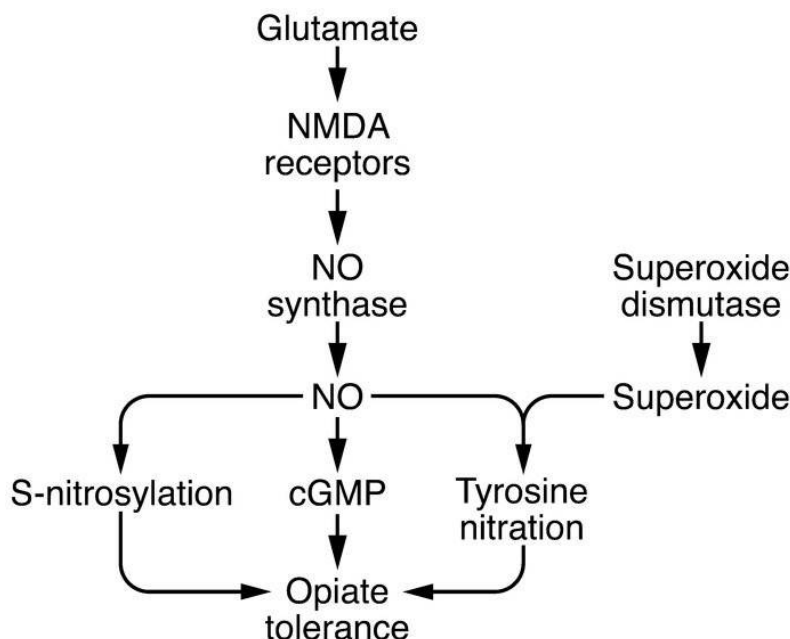
Nejvíce studovaný mechanismus vzniku tolerance je systém glutamát/NMDA receptor/NO (obr. 3). Důležitost NMDA receptoru v toleranci byla objevena asi před dvaceti lety<sup>30</sup>. Bylo zjištěno, že přerušení signalizační kaskády zahrnující NMDA receptor a NO (oxid dusnatý) zabrání vytvoření tolerance. Vzniku tolerance můžeme předejít podáním NMDA antagonistů či inhibitorů NO syntázy.<sup>29</sup>

Aktivací NMDA receptoru glutamátem dochází k aktivaci enzymu NOS (NO syntáza), která katalyzuje tvorbu NO. Molekula plynu NO nemůže být v buňce uložena, a tak proniká přes membrány, kde může působit třemi mechanismy:

- 1) vytváří komplex s hem-jednotkou guanylát cyklázy, která se tak aktivuje
- 2) nitrosyluje proteiny – podjednotku 1 a podjednotku 2 NMDA receptoru

- 3) pokud je vystaven superoxidu, který je vyráběn superoxid dismutasou, NO je přeměněn na peroxynitrid, který následně nitruje tyrosinové zbytky v proteinech - včetně glutamátového transportéru GLT-1 a enzymu glutamin syntázy.

Všechny tyto tři mechanismy mohou vést k vytváření tolerance na opioidy.<sup>29</sup>



Obr. 3 Schéma signalizační kaskády NMDA receptoru/NO (převzato z citace 29)

## 4. Oxidativní stres

### 4.1. Oxidativní stres

Oxidativní stres je stav, kdy tvorba volných radikálů nebo reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňce přesahuje schopnost antioxidačních mechanismů tyto radikály eliminovat. Rychlost produkce reaktivních forem kyslíku je závislá především na rychlosti metabolismu buněk. Při vyšší rychlosti metabolismu dochází k významnému zvýšení tvorby ROS a volných radikálů, které mohou poškodit celou řadu tkání.<sup>31</sup> ROS se zpravidla tvoří v nízkých koncentracích za normálních aerobních podmínek a poškození buňky, které způsobují, je neustále opravováno.<sup>32</sup>

V organismu existují antioxidační enzymy, které pomáhají chránit buňky před oxidativním stresem. Těmito enzymy jsou např. superoxiddismutasa (SOD), glutathionperoxidasa (GSHPx) a katalasa. Před oxidativním stresem také pomáhá chránit tripeptid glutathion (GSH). Všechny eukaryotní buňky si udržují vysokou koncentraci intracelulárního GSH a jeho analogů, neboť při jeho vyčerpání dochází okamžitě k buněčnému poškození. GSH je tripeptid složený ze tří aminokyselin: kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu.<sup>33</sup>

Oxidativní stres může být tedy výsledkem:

- 1) snížené hladiny antioxidantů – jejich nedostatek v jídle či nedostatečné množství antioxidačních enzymů
- 2) zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku, přítomnost toxinů, které produkují reaktivní částice (např.  $\text{CCl}_4$  – tetrachlormetan, benzen a jeho deriváty, tetracykliny, etanol, pentachlorfenol používaný jako herbicid a insekticid).<sup>34</sup>

#### 4.1.1. Důsledky oxidativního stresu

Důsledek oxidativního stresu závisí na typu buňky a na závažnosti stresu. Může dojít k proliferaci (rychlé množení), adaptaci, buněčnému poškození, stárnutí a buněčné smrti.<sup>34</sup>

- 1) Zvýšená proliferace – mnoho buněk reaguje na mírný oxidativní stres rychlým množením buněk.
- 2) Adaptace – přizpůsobení buněk nebo organismu regulací obranných systémů, které mohou:
  - a) úplně chránit před poškozením
  - b) chránit před poškozením jen do určité míry
  - c) učinit buňky rezistentní proti vyšším úrovním oxidativního stresu
- 3) Poškození buněk – jedná se o poškození některých nebo všech molekulárních cílů: např. lipidy, DNA, proteiny, sacharidy. Takové poškození může někdy vést k adaptaci.
- 4) Stárnutí – je vyvolané velkým množstvím reaktivních částic. Buňky přežívají, ale již se nemohou dělit.
- 5) Buněčná smrt – po poškození buňka může:
  - a) zotavit se z oxidativního poškození opravením nebo nahrazením poškozené molekuly
  - b) přežít s trvalým poškozením
  - c) oxidativní poškození, zejména DNA, může vést k apoptóze či nekróze

#### 4.1.2. Oxidativní stres a nemoci

Lidské tělo je stálým zdrojem produkce reaktivních forem kyslíku. ROS se mohou významně podílet na vzniku a rozvoji některých nemocí, jako je např. rakovina, ateroskleróza, malárie, revmatoidní artritida, diabetes, nemoci ledvin, jater, předčasné stárnutí, neurodegenerativní, kardiovaskulární, respirační, autoimunní choroby.<sup>35</sup>

Oxidativní stres byl prokázán i u Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby. Oxidativní poškození mozkové tkáně bylo zaznamenáno v prvních fázích Alzheimerovy choroby. Mozková tkáň se skládá převážně z lehce oxidovatelných lipidů, je zde větší spotřeba kyslíku a málo endogenních antioxidantů, a proto je náchylnější k oxidativnímu poškození. Bylo prokázáno, že k tomuto poškození dochází u starších pacientů, neboť stárnutí je hlavním rizikovým faktorem Alzheimerovy choroby. Dalším

faktorem je zvýšená koncentrace volného železa v mozkové tkáni, která může zvýšit množství ROS.<sup>36</sup>

Parkinsonova choroba je jedna z nejběžnějších chronických neurodegenerativních chorob charakterizovaná úbytkem neurotransmiteru dopaminu, který zajišťuje přenos signálu mezi neurony. Nedostatek dopaminu způsobuje svalovou ztuhlost, třes, poruchy chůze a rovnováhy. Zvýšené množství železa, oxidace proteinů, peroxidace lipidů a nižší koncentrace glutathionu indikuje zapojení ROS do patogeneze Parkinsonovy choroby.<sup>37</sup>

ROS také poškozuje buněčné komponenty v chrupavce narušením chondrocytů, což vede k osteoartritidě.<sup>38</sup> Některé studie navrhuji, že ROS hrají roli v poškození Langerhansových ostrůvků.<sup>39</sup> Bylo studováno i zapojení ROS a hypofunkce NMDA receptoru v patofyziologii schizofrenie.<sup>40</sup> Velké množství ROS v ledvinách vede k urolitiáze. Hyperglykémie spouští tvorbu ROS v tubulárních buňkách ledvin, způsobuje strukturální a funkční změny v glomerulu, což vede k diabetické neuropatii.<sup>32</sup>

## 4.2. Volné radikály

Volný radikál je chemická částice, která má jeden nebo více nepárových elektronů ve vnějším orbitalu. Volným radikálem může být malá molekula nebo iont. Jsou to vysoce reaktivní částice s malou aktivační energií a krátkou životností. Jejich malá velikost jim umožňuje pronikat buněčnými membránami.<sup>41</sup>

Volné radikály mohou být aniontové, kationové nebo neutrální. Mezi volné radikály patří atom vodíku (jeden nepárový elektron), ionty přechodných kovů (železo, měď, mangan), anorganické sloučeniny - oxid dusnatý (NO) a oxid dusičitý (NO<sub>2</sub>). Další biologicky důležité radikály jsou reaktivní formy kyslíku (např. superoxidový, hydroxylový radikál, singletový kyslík, peroxid vodíku). Volné radikály poprvé dokázal roku 1900 Gomberg, který popsal rozklad hexafenyletanu na dva trifenylmethylové radikály.<sup>42</sup>

### 4.2.1 Reaktivní formy kyslíku

Mezi významné reaktivní formy kyslíku patří následující radikály: hydroxylový (OH·), superoxidový ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), oxid dusnatý (NO·) a peroxy (RO<sub>2</sub>·). Mezi ROS také patří kyselina chlorná (HClO), peroxyinitrit (ONOO·), peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singletový kyslík (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) a ozon (O<sub>3</sub>) – nejsou volnými radikály, ale mohou snadno vést k reakcím, při kterých vznikají volné radikály.<sup>43</sup>

Reaktivní formy kyslíku mohou vznikat z exogenních i endogenních zdrojů:<sup>44</sup>

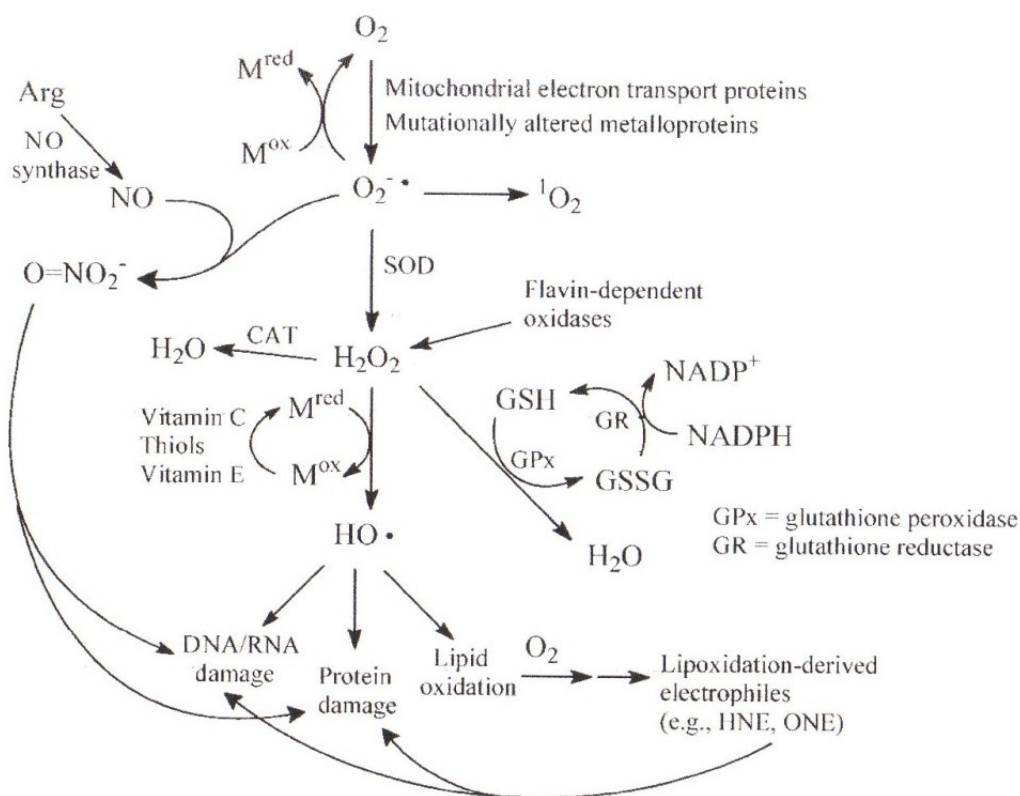
a) exogenní zdroje:

- 1) UV, rentgenové a gama záření
- 2) xenobiotika, chlorované sloučeniny
- 3) mohou se vyskytovat v ovzduší jako znečišťující látky

b) endogenní zdroje:

- 1) při reakcích katalyzovaných přechodným kovem
- 2) při transportu elektronů v mitochondriích, endoplasmatickém retikulu či fosfolipidové dvojvrstvě
- 3) jsou produkovány neutrofily a makrofágy při zánětu.

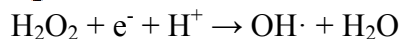
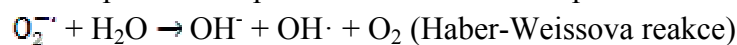
Schematické znázornění vzniku různých reaktivních forem kyslíku, jejich účinků je na obr. 4



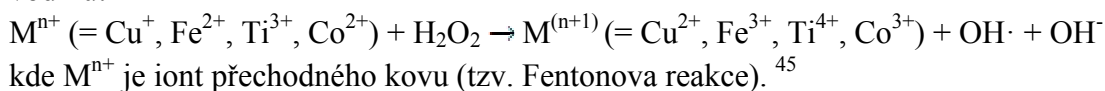
Obr. 4 Schematické znázornění vzniku reaktivních forem kyslíku. Arg = arginin, SOD = superoxiddismutasa, CAT = katalasa, GSH = glutathion, GPx = glutathionperoxidasa, GR = glutathionreduktasa, NADP<sup>+</sup> = nikotinamidadenindinukleotid fosfát (cit. 36)

#### 4.2.1.1. Hydroxylový radikál ( $OH\cdot$ )

Hydroxylový radikál je pravděpodobně jeden z nejreaktivnějších kyslíkových radikálů s vysokou oxidační schopností. Má velmi krátkou dobu života, přibližně  $10^{-9}$  s. Hydroxylové radikály jsou eliminovány prakticky na stejném místě vzniku, protože mohou reagovat s první molekulou, se kterou se setkají. Hydroxylový radikál vzniká především při nadměrné produkci superoxidového radikálu a peroxidu vodíku:



Může být vytvářen různými mechanismy: ionizující záření způsobuje rozklad vody, což vede k tvorbě  $\text{OH}\cdot$  a atomů vodíku, fotolytický rozklad alkylhydroperoxidů. Velká část hydroxylových radikálů pochází z kovem katalyzovaného rozkladu peroxidu vodíku:



#### 4.2.1.2. Superoxidový radikál ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )

Superoxidový radikál vzniká jedoelektronovou redukcí molekuly kyslíku:



Mezi produktem je radikál  $\text{HOO}\cdot$  (hydroperoxyl), který má vyšší reaktivitu a je lepším redukčním činidlem než  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .<sup>40</sup>

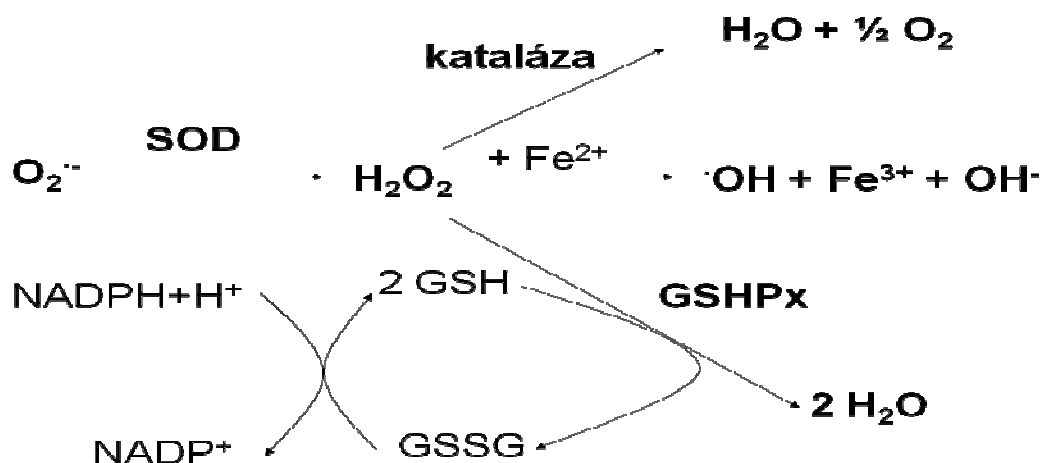
Tento radikál je nestabilní ve vodném prostředí kvůli své schopnosti spontánně reagovat s dalším superoxidovým radikálem za vzniku peroxidu vodíku a molekulárního kyslíku.<sup>46</sup>



Superoxidový radikál může být produkovan některými enzymy např. aldehydoxidáza, xanthinoxidáza. Může také vznikat v mitochondriálním respiračním řetězci a při oxidaci hemu.<sup>40</sup> Enzym, který rozkládá superoxidový radikál, se nazývá superoxid dismutaza (SOD). Patří do třídy oxidoreduktáz. Superoxidový radikál je tímto enzymem rozkládán (podle výše uvedené rovnice) na peroxid vodíku a molekulární kyslík (obr. 5). Peroxid vodíku je dále eliminován glutathionperoxidasou či katalasou.<sup>47</sup>

#### 4.2.1.3. Peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Peroxid vodíku vzniká v organismu při enzymatických reakcích např. při rozkladu  $\text{O}_2^{\cdot-}$  superoxidodismutasou (obr. 5). Doba života peroxidu vodíku při 37°C je počítána na minuty. Peroxid vodíku snadno proniká membránami, kde reaguje s ionty přechodných kovů (hlavně s  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ ) a vytváří reaktivní sloučeniny. Při těchto reakcích může vznikat hydroxylový radikál.<sup>48</sup>



Obr. 5 Schéma rozkladu superoxidového radikálu. SOD = superoxiddismutasa, GSHPx = glutathionperoxidasa, GSH = glutathion, GSSG = oxidovaný glutathion,  $NADP^+$  = nikotinamidadenindinukleotid fosfát (upraveno podle citace 47)

#### 4.2.1.4. Singletový kyslík ( $^1O_2$ )

Singletový kyslík je reaktivní forma kyslíku, při které se jeden ze dvou nepárových elektronů excitací (vybuzením) přemístí ze svého základního stavu do stavu s vyšší energetickou hladinou, přičemž změní svůj spin.<sup>49</sup>

Singletový kyslík má dobré oxidační vlastnosti. Může přímo oxidovat proteiny, lipidy a DNA. Singletový kyslík reaguje s ostatními molekulami dvěma způsoby: může s nimi reagovat chemicky nebo jim může předat svou excitační energii, čímž se vrací zpět do základního stavu, zatímco druhá molekula vstupuje do excitačního stavu.

Singletový kyslík často vzniká procesem zvaným fotosenzibilizace. Fotosenzitizer je chemická látka citlivá na světlo. Pokud tuto látku vystavíme světelnému záření o určité vlnové délce, kterou bude absorbovat, zvýší se její energie a molekula přejde do excitovaného stavu. Tuto excitační energii předá molekulám kyslíku a vznikne vysoce oxidativní singletový kyslík. Fotosenzitizer se po předání energie vrací zpět do základního stavu. V laboratoři se jako fotosenzitizery nejčastěji používají methylenová modř, bengálská červeň. Mezi fotosenzitizující látky patří i několik biomolekul: riboflavin (vitamin B2), chlorofyl a, b, bilirubin a různé porfyriny.<sup>50</sup>

#### 4.2.1.5. Oxid dusnatý a peroxynitrit

Oxid dusnatý je volný radikál obsahující jeden nepárový elektron ve vnější slupce molekulového orbitalu. V organismu vzniká z L-argininu za přítomnosti kyslíku, NADPH a NO syntáz. Je poměrně nestabilní. Jeho poločas rozpadu je jen několik sekund (1-10 s při teplotě 37°C).<sup>48</sup>

Oxid dusnatý je plyn, který se volně šíří přes membrány a působí na několik cílových molekul. Váže se na guanylylcyklasu (GC), aktivuje enzym a stimuluje

produkci cyklického guanosin monofosfátu (cGMP). Tento druhý posel fosforyluje proteinkinasu G (PKG), která má řadu funkcí např. fosforylací iontových kanálů dochází ke snížení intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ . V buňkách hladké svaloviny cév způsobuje oxid dusnatý uvolnění a vazodilataci.<sup>51</sup>

Oxid dusnatý reaguje snadno s ostatními volnými radikály. Při reakci se superoxidovým radikálem vzniká peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ):



Peroxynitrit je silné oxidační činidlo. V roztoku je stabilní. To je dáno možností vytvořit cis-konformaci, při které se negativní náboj rozloží po celé molekule. Dále molekula vytváří silné vodíkové vazby se dvěma nebo třemi molekulami vody.<sup>52</sup>

#### 4.2.1.6. Kyselina chlorná ( $\text{HClO}$ )

Kyselina chlorná je produkována enzymem myeloperoxidasou v místě zánětu, když aktivované neutrofily pronikají postiženou tkání. Enzym za přítomnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxiduje chloridové anionty  $\text{Cl}^-$ . Podle jedné studie vytvoří  $5 \times 10^6$  aktivovaných lidských neutrofilů při 22°C během 2 hodin v 1 ml roztoku 88  $\mu\text{M}$   $\text{HClO}$ .<sup>43</sup>

Kyselina chlorná je silné oxidační činidlo. Ve vysokých koncentracích má cytotoxické účinky. Nižší dávky  $\text{HClO}$  mohou ovlivnit buněčné funkce, včetně různých signálních drah. Také zastavuje růst buněk a způsobuje apoptózu.<sup>53</sup>

### 4.3. Prooxidanty

Jako prooxidanty jsou označovány látky, které vyvolávají oxidativní stres. Mohou buď vytvářet ROS, nebo inhibovat antioxidační systém. Oxidativní stres vyvolaný těmito látkami může poškozovat buňky, tkáň nebo může být příčinou některých onemocnění. Prooxidační účinek mají ionty přechodných kovů. Zvýšená hladina železa vede k onemocnění hemochromatóza. Další onemocnění spojené se zvýšenou hladinou přechodných kovů je např. Wilsonova choroba (nadměrné množství mědi v tkáních). Některé vitamíny mohou vytvářet ROS. Vitamin C má antioxidační účinky, nicméně může redukovat přechodné ionty kovů, což povede ke tvorbě volných radikálů přes Fentonovu reakci. Mezi prooxidanty patří mnoho látek např. kyselina močová, morfin, paracetamol, cisplatina.<sup>32</sup>

### 4.4. Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které omezují aktivitu toxických oxidantů (volných radikálů). Snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí na méně reaktivní či nereaktivní molekuly. Tím omezují proces oxidace.

Antioxidanty mohou být přírodního nebo syntetického původu. Dále je můžeme rozdělit do dvou skupin v závislosti na tom, zda jsou rozpustné ve vodě (hydrofilní antioxidanty) nebo v lipidech (hydrofobní antioxidanty). Obecně platí, že ve vodě rozpustné antioxidanty reagují s volnými radikály v buněčném cytosolu a krevní plazmě. Hydrofobní antioxidanty chrání buněčné membrány před lipoperoxidací.



Antioxidanty mohou být syntetizovány přímo v organismu nebo mohou být získány z potravy. Velikost ochrany poskytovaná některým z antioxidantů závisí na jeho koncentraci v organismu a na jeho reaktivitě ke konkrétnímu ROS.<sup>54</sup>

Antioxidační obranný systém organismu je tvořen látkami enzymatické a neenzymatické povahy. Pracují společně a současně tak zabráňují oxidačnímu poškození buněčných komponent. Brání vzniku reaktivních forem kyslíku nebo se snaží je odstranit dříve, než poškodí životně důležité části buňky.<sup>32</sup>

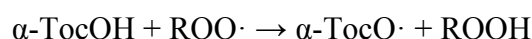
#### 4.4.1. Neenzymatické antioxidanty

Nejdůležitějším krokem v obraně organismu proti působení ROS je proces zvaný deaktivace. Při tomto procesu dochází k zachycení již vytvořených volných radikálů a zamezení jejich dalších reakcí. Vzhledem k charakteru volných radikálů je zde tendence vzniku řetězových reakcí, kdy radikál reaguje za vzniku dalšího radikálu. Neméně důležitým krokem je přenést radikál z citlivého cílového místa na místo, kde je méně škodlivý. To obecně znamená převedení radikálu z hydrofobní fáze do fáze hydrofilní např. z membrány do cytosolu nebo z lipoproteinů k vodné fázi plasmy.<sup>55</sup>

Mezi neenzymatické antioxidanty patří vitamín E, C,  $\beta$ -karoten, kyselina močová, melatonin, glutathion, koenzym Q10 a chelátory.

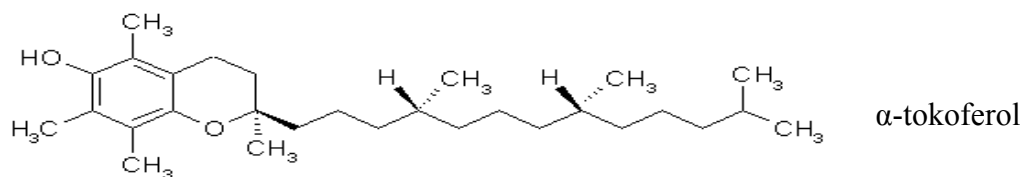
##### 4.4.1.1. Vitamín E

Vitamín E je souhrnné označení pro skupinu látek nazývaných tokoferoly. Jsou to deriváty 6- hydroxychromanu neboli tokolu. Může mě rozdělit do dvou skupin: tokoferoly (Toc) a tokotrienoly (Toc-3). Každá skupina obsahuje 4 izomery ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -). Tokoferoly jsou látky rozpustné v tucích. Nejdůležitějším antioxidantem této skupiny je  $\alpha$ -tokoferol (5,7,8- trimethyltokol). Tokoferoly pracují jako antioxidanty tak, že darují atom vodíku z hydroxylové skupiny peroxiradikálu ( $\text{RO}_2\cdot$ ) a tím zastavují řetězovou reakci.



Radikál vytvořený z  $\alpha$ -tokoferolu je stabilizován přemístěním volného elektronu na aromatický kruh. Tento radikál může reagovat s dalším  $\text{RO}_2\cdot$  za vzniku stabilního  $\alpha$ -tokoferolperoxidu.

Zdrojem vitamínu E jsou např. za studena lisované rostlinné oleje, pšeničné klíčky, ořechy, lněná, sezamová, dýňová semínka, listová zelenina (špenát) a sojové boby.<sup>56</sup>



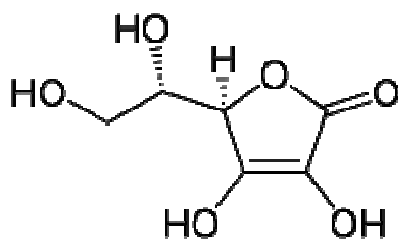
#### 4.4.1.2. Kyselina L-askorbová (vitamín C)

Vitamín C patří mezi vitamíny rozpustné ve vodě. Je jedním z nejvýznamnějších antioxidantů. Reaguje s ROS, jako jsou např. superoxidový a hydroxylový radikál, peroxid vodíku, singletový kyslík a chlornany.<sup>48</sup> Redukuje radikál vytvořený z  $\alpha$ -tokoferolu, brání tak jeho reakci s dalším peroxiradikálem a nedochází ke tvorbě peroxidů. Tímto mechanismem chrání lipidy v buněčné membráně.<sup>57</sup>

Vitamín C je důležitý pro metabolismus aminokyselin. Je esenciálním kofaktorem pro hydroxyprolin a hydroxylysin (složky kolagenu). Nedostatek vitamínu C se projevuje menší pevností cévní stěny, sníženou pevností vazivového aparátu zubu a s tím spojené vypadávání zubů, zvýšenou krvácivostí. Je důležitý pro růst, vývoj kostí a zubů. Jeho nedostatek v potravě končí kurdějemi.<sup>58</sup>

Zdrojem vitamínu C jsou především citrusové plody (citrón, pomeranč, limetka, grapefruit), černý rybíz, jahody, kiwi, brusinky. Bohatým zdrojem jsou i plody šípku.

Vitamín C může být i prooxidantem. Dokáže vytvářet ROS a to tak, že redukuje přechodné ionty kovů, což vede ke tvorbě volných radikálů přes Fentonovu reakci.



Kyselina L-askorbová

#### 4.4.1.3. $\beta$ -karoten

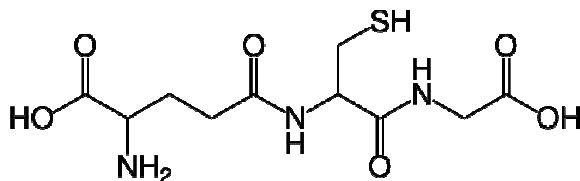
$\beta$ -karoten je významný karotenoid a prekurzor vitamínu A. Z jedné molekuly  $\beta$ -karotenu vznikají 2 molekuly vitamínu A.  $\beta$ -karoten funguje jako antioxidant. Ve své struktuře obsahuje konjugované dvojné vazby. Jeho antioxidační činnost vzniká v důsledku schopnosti delokalizace nespárovaných elektronů.  $\beta$ -karoten může inhibovat volné radikály, především singletový kyslík a peroxyradikály. Koncentrace karotenoidů a parciální tlak kyslíku jsou důležitými faktory v jejich účinnosti jako antioxidanty. Karotenoidy, zejména  $\beta$ -karoten vykazuje antioxidační vlastnosti při nízkém parciálním tlaku kyslíku. Naopak při vysokém parciálním tlaku kyslíku či vysoké koncentraci karotenoidů mohou působit jako prooxidanty.<sup>59</sup>

#### 4.4.1.4. Kyselina močová

Kyselina močová je jedním z nejdůležitějších antioxidantů v plasmě. Je koncovým produktem metabolismu purinů. Uráty (soli kyseliny močové) reagují se superoxidovým, hydroxylovým radikálem a singletovým kyslíkem. Mohou tvořit cheláty s ionty přechodných kovů. Kyselina močová také blokuje reakci superoxidového radikálu s oxidem dusnatým, při které vzniká peroxynitrit.<sup>60</sup>

#### 4.4.1.5. Glutathion (GSH)

Glutathion je endogenní antioxidant. Je potřebný pro zachování thiol redoxního stavu buněk. Hraje důležitou roli v ochraně proti oxidačnímu poškození, detoxikaci exogenních i endogenních reaktivních iontů kovů, přenosu a skladování cysteinu, regulaci buněčného cyklu a buněčném dělení. Glutathion hraje klíčovou roli v ochraně buněk proti ROS. Ve své struktuře obsahuje cystein, který poskytuje thiolovou skupinu. ROS jsou redukovány glutathionem za přítomnosti glutathionperoxidasy. GSH se oxidauje na GSSG, který je rychle redukován zpět na glutathion enzymem glutathionreduktasa na úkor NADPH.<sup>32</sup>



Glutathion

#### 4.4.1.6. Koenzym Q10

Koenzym Q10, známý též jako ubichinon, byl poprvé izolován roku 1957 z mitochondrií hovězího srdce. Je to lipofilní benzochinon, který u člověka a většiny savců v postranním řetězci obsahuje 10 isoprenylových podjednotek. Koenzym Q10 je součástí dýchacího řetězce, ve kterém zastává funkci elektronového přenašeče a podílí se na syntéze vysokoenergetického substrátu ATP. Koenzym Q10 se může vyskytovat ve třech hlavních redoxních formách: plně oxidovaný (CoQ, ubichinon), částečně redukováný (CoQH $\cdot$ , semichinon) a plně redukováný (CoQH $_2$ , ubichinol). Plně redukováný koenzym Q10 má největší antioxidační účinky. V této formě drží elektrony volně a snadno je poskytne k neutralizaci volných radikálů, které ohrožují buněčné komponenty, jako jsou DNA, RNA a buněčné membrány. Antioxidační vlastnosti koenzymu Q10 přispívají k ochraně lipidů před peroxidací. Bylo zjištěno, že je velmi efektivně chrání LDL (nízkodenzitní lipoprotein) před oxidací, která je důležitým krokem ve vývoji aterosklerózy.<sup>61</sup>

#### 4.4.1.7. Chelátory

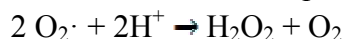
Mezi nejznámější chelátory přenášející ionty přechodných kovů patří transferin, ferritin (pro ionty železa) a ceruloplasmin (pro ionty mědi). Volné ionty přechodných kovů mohou být v organismu toxické, protože katalyzují reakce, při kterých vznikají volné radikály (Fentonova, Haber-Weissova reakce). Úkolem chelátorů je na sebe navázat tyto ionty, čímž se sníží jejich toxicita. Další funkcí je přenos těchto iontů do míst, kde je jich potřeba.<sup>48</sup>

## 4.4.2. Enzymatické antioxidanty

Antioxidační enzymy jsou součástí mechanismů pro boj s oxidativním stresem. Mezi nejvýznamnější antioxidační enzymy patří superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa a glutathionreduktasa.

### 4.4.2.1. Superoxiddismutasa (SOD)

Superoxiddismutasa patří do třídy metaloenzymů, jejíž aktivní centrum je obsazené ionty kovů (měď, zinek, mangan a železo). SOD hraje velmi důležitou roli v ochraně všech aerobních systémů, které chrání před účinky ROS. Superoxiddismutasa katalyzuje dismutaci superoxidového radikálu na molekulární kyslík a peroxid vodíku, který je následně rozkládán katalasou či peroxidasami:

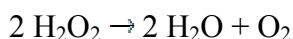


Rozlišujeme 4 druhy SOD podle kofaktoru: Cu/Zn-SOD, která váže ionty mědi a zinku. Fe-SOD, Mn-SOD a Ni-SOD, které váží ionty železa, manganu nebo niklu. Cu/Zn-SOD je dimer o molekulové hmotnosti 32 kDa. Jeho dvě podjednotky jsou spojeny disulfidickým můstkem. Vyskytuje se v cytosolu eukaryotických buněk. Ionty železa a manganu byly ve struktuře SOD nalezeny u prokaryot, prvoků a v mitochondriích. Některé bakterie mohou obsahovat Fe-SOD, jiné Mn-SOD, a některé obsahují oba typy.

Množství SOD v organismu klesá s věkem, takže buňky jsou pak mnohem náchylnější k účinkům ROS, které způsobují stárnutí a smrt buněk. SOD se přirozeně vyskytuje v brokolici, kapustě, pšenici a ve většině zelených rostlin.<sup>32</sup>

### 4.4.2.2. Katalasa (CAT)

Katalasa je enzym, který katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík:



Ve své struktuře obsahuje hemové (železnaté) skupiny, které jí umožňují reagovat s peroxidem vodíku. Katalasa byla nalezena v peroxizomu eukaryot. Katalasa hraje klíčovou roli při stárnutí. Snížená hladina tohoto enzymu vede k šednutí vlasů v důsledku zvýšené koncentrace peroxidu vodíku, který bělí vlas zevnitř.<sup>32</sup>

### 4.4.2.3. Glutathionperoxidasa (GSHPx, GPx)

Existují nejméně 4 druhy GPx u savců, označované GPx1-4. Všechny tyto peroxidasy jsou selen-dependentní. Ke své aktivaci tedy potřebují selen, který je v aktivním místě vázán jako selenocystein (cystein, který má místo atomu síry navázán selen). Selen jako složka glutathionperoxidasy je schopen zpomalit rychlost peroxidace lipidů, a tím i výsledné poškození buněčné stěny. GPx se také podílí na odstranění peroxidu vodíku přeměnou na vodu a GSSG (oxidovaný glutathion):



GPx1 a GPx4 se nachází v cytosolu, GPx2 v buněčné výstelce gastrointestinálního traktu. GPx3 se nalézá v plasmě, byla však nalezena i v extracelulárních tekutinách, např. v mléku, spermiích, nitrooční tekutině. Vysoká koncentrace GPx4 byla zjištěna ve varlatech. GPx4 hraje klíčovou roli při zrání spermií, urychluje oxidaci thiolových skupin proteinu v hlavičce spermie.<sup>62</sup>

#### 4.4.2.4. Glutathionreduktasa (GR)

Glutathionreduktasa je enzym, který katalyzuje redukci GSSG zpět na GSH:



Glutathionreduktasa obsahuje dvě podjednotky, každou s FAD (flavinadenin dinukleotid) v aktivním místě. NADPH redukuje FAD, který předá své elektrony disulfidickému můstku. Vznikají tak dvě -SH skupiny, které reagují s GSSG a dochází k vytvoření dvou molekul GSH.

Glutathionreduktasa může být *in vitro* a *in vivo* inhibována látkou BCNU (karmustin). Karmustin, chemicky N,N-bis(2-chlorethyl)-N-nitrosurea, je látka používaná v chemoterapii při léčbě rakoviny plic, mozku, střev, Hodgkinsově chorobě.<sup>62</sup>

### 5. Opioidy a oxidativní stres

Jak již bylo zmíněno, oxidativní stres je způsoben nedostatečnou schopností buněk neutralizovat volné radikály a reaktivní formy kyslíku. Reakce a následné účinky volných radikálů či ROS jsou tedy hlavní příčinou oxidativního stresu. Všechny látky, které se určitým způsobem podílejí na produkci volných radikálů nebo ROS (samy jsou volnými radikály nebo se svými reakcemi podílejí na jejich vytváření), jsou potenciálně zodpovědné za rozvinutí oxidativního stresu.

Podle dostupných publikací a klinických studií jednou ze skupin látek, které způsobují oxidativní stres, jsou opioidy a látky od nich odvozené. Opioidy se na vzniku oxidativního stresu mohou podílet dvěma způsoby. Mohou svými reakcemi vytvářet volné radikály (např. oxid dusnatý vytvořený morfinem). Druhý častější způsob je snižování aktivity složek antioxidačního systému (např. snížení aktivity glutathionperoxidasy či katalasy po expozici heroinu).

V následující části této práce bude na několika příkladech ukázáno, že účinky opioidů a látek od nich odvozených vedou k oxidativnímu stresu.

#### 5.1. Morfinem vyvolaný oxidativní stres

Morfin je přírodně se vyskytující alkaloid opia. Je agonistou  $\mu$  receptorů a částečným agonistou  $\delta$  receptorů. Morfin patří mezi analgetika anodyna. Svým silným analgetickým účinkem se používá k tlumení nesnesitelných akutních i chronických bolestí (po úrazech, bolesti spojené s rakovinou). Dříve se jako hlavní složka opiové tinktury používal k léčbě nezvladatelných průjmů. Jeho působení v organismu vyvolává mnoho nežádoucích účinků, např. tolerance, fyzická závislost, dechová deprese, snížení

pohyblivosti střev, nevolnost, zvracení, mióza.<sup>63</sup>

Je známo, že oxidativní stres poškozuje biomolekuly, jako je DNA, lipidy. Morfinem vyvolaný oxidativní stres mění mastné kyseliny v mozku a míšní tkáni. Po podání morfinu dochází ke snížení koncentrace mastných kyselin v mozku a míšní tkáni v důsledku zvýšené peroxidace lipidů a snížení hladiny GSH (tbl. 2).<sup>64</sup>

Oxidativní stres je jednoznačně spojován se snížením GSH a omega-3 polynenasycených kyselin (PUFAs).<sup>65</sup> Mozek spotřebuje největší množství kyslíku v celém těle (kolem 60%). Ačkoli většina kyslíku je zde přeměněna na vodu a oxid uhličitý, z malého množství vznikají ROS. Přítomnost PUFAs, které jsou v mozku a míšní tkáni hlavními cíly ROS, činí tyto orgány citlivé na oxidativní poškození.<sup>66</sup> Existují antioxidační mechanismy, které v mozku neutralizují poškození způsobené ROS, ale působením morfinu se snižuje účinnost těchto mechanismů a dochází ke zvýšené tvorbě volných radikálů.<sup>67</sup> Morfin také zvyšuje množství extracelulárního dopaminu uvolňovaného z dopaminergních neuronů. V synaptické štěrbině může být dopamin rozkládán monoaminoxidasou B (MAO-B) na 3,4- dihydroxyfenyl octovou kyselinu a peroxid vodíku. Peroxid vodíku může reagovat s ionty přechodných kovů a vytvořit vysoce reaktivní hydroxylový radikál.<sup>66</sup> Morfin je také schopen vyvolat oxidativní poškození buněk a neurodegeneraci.<sup>68</sup> Bylo též dokázáno, že metabolity morfinu přímo ovlivňují vznik superoxidového radikálu v mezangiálních buňkách glomerulu.<sup>64</sup> Nejen morfin, ale také kokain a methadon, mohou být zřejmě metabolizovány na reaktivní sloučeniny s povahou volných radikálů, které se mohou podílet na oxidativním poškození buněk.<sup>69</sup>

### 5.1.1. Morfinem vyvolaný oxidativní stres v jaterních buňkách

Výsledky nedávného výzkumu ukázaly, že hepatotoxicita navozená morfinem a jeho derivátem heroinem může souviset s oxidativním stresem. Přitom bylo zjištěno, že po expozici morfinu dochází k oxidativnímu poškození DNA, proteinů, lipidů, snížení aktivity antioxidačních enzymů (SOD, katalasy, GSHPx).<sup>70</sup> Nadměrná produkce ROS může vést až k buněčné smrti prostřednictvím apoptózy nebo nekrózy (morfin může vyvolat apoptózu lymfocytů<sup>71</sup>). Bylo také dokázáno, že exogenní antioxidanty (kyselina L-askorbová,  $\alpha$ -tokoferol) jsou schopné snížit oxidativní poškození DNA, proteinů a lipidů.<sup>69</sup> Podle činnosti plasmové alaninaminotransferasy je možné posoudit závažnost hepatotoxicity. Zvýšená aktivita alaninaminotransferasy poukazuje na vážné poškození jater. Tak je tomu i při působení morfinu.<sup>70</sup> Chronická expozice morfinu zeslabuje funkci jaterních antioxidačních systémů a vyvolává apoptózu jaterních buněk. Prooxidační účinky morfinu byly vyvolány jak jednotlivou vysokou dávkou, tak opakovanými nízkými dávkami.<sup>72</sup>

Bylo zjištěno, že oxidativní stres hraje důležitou roli v apoptóze hepatocytů během cholestázy.<sup>73</sup> Cholestáza je definovaná jako porucha tvorby a vylučování žluči nebo selhání organismu dodat do duodena dostačující množství žluči. Může skončit

jaterní cirhózou či selháním jater.<sup>74</sup> Několik klinických a experimentálních studií ukázalo, že při cholestáze byla zvýšená hladina ROS a toxických produktů peroxidace lipidů.<sup>75, 76</sup> Zajímavé je zjištění, že proapoptické a prooxidační účinky morfinu jsou zprostředkované opioidními receptory. Při zablokování těchto receptorů (např. antagonistou naltrexonem), dochází ke snížení apoptózy hepatocytů. Ukázalo se, že chronické podávání naltrexonu ve vyšších dávkách výrazně zvyšuje koncentraci GSH v játrech a snižuje plasmatickou koncentraci TNF- $\alpha$  a infiltraci neutrofilů.<sup>77</sup> Naltrexon vyvolává ochranné účinky tím, že blokuje opioidní receptory. Mechanismus, jehož prostřednictvím je oxidativní stres během cholestázy vyvolán, není doposud dobře znám. Jeden z možných mechanismů poukazuje na prooxidační vlastnosti žlučové kyseliny. Žlučové kyseliny vzhledem ke své povaze mohou přímo poškodit tkáň nebo mohou aktivací leukocytů uvolnit ROS.<sup>75</sup> Předpokládá se, že žlučové kyseliny v hepatocytech během cholestázy stimulují vznik ROS vedoucí k peroxidaci lipidů a ztrátě životaschopnosti buněk.<sup>78</sup> Morfinem vyvolaná apoptóza hepatocytů byla také inhibována podáním exogenního thiolového antioxidantu N-acetylcysteinu.<sup>79</sup> Za normálních podmínek jsou hepatocyty chráněny endogenním antioxidačním systémem, který zahrnuje následující enzymy: GSH, SOD, CAT, GPx a GR. Podáním opioidů dochází ke snížení aktivity těchto enzymů.<sup>80</sup>

### 5.1.2. Vznik ROS zprostředkovaný fosfolipasou D2

Bylo dokázáno, že aktivace  $\mu$  receptoru agonistou DAMGO [(D-Ala<sup>2</sup>, Me Phe<sup>4</sup>, Glyol<sup>5</sup>)enkefalin],  $\beta$ -endorfinem, methadonem, fentanylem či sufentanylem vede ke zvýšené aktivitě fosfolipasy D2 (PLD2) a endocytóze opioidního receptoru. MOR zprostředkovaná aktivace fosfolipázy stimuluje produkci ROS přes NADH/NADPH oxidasu. Agonisté jako je morfin, buprenorfin a oxykodon nevyvolávají endocytózu opioidního receptoru, ale také neaktivují PLD2 a syntézu ROS.<sup>81</sup>

PLD2 hydrolyzuje fosfatidylcholin na cholin a kyselinu fosfatidovou (PA). PLD2 je přítomna ve všech savčích buňkách. Hraje důležitou roli v přenosu signálu. PA reguluje aktivitu NADH/NADPH oxidasy. Při reakcích katalyzovaných NADH oxidasu dochází k vytváření superoxidového radikálu, který je SOD přeměněn na peroxid vodíku. Dále se PA zapojuje do mnoha intracelulárních signalizací jako je aktivace tyrosinkinasy, NADPH oxidasy a GTPasy, jejichž aktivace může vést k produkci ROS.<sup>82</sup>

Chronická léčba vysokými dávkami opioidů (morfin, buprenorfin, oxykodon) vyvolává oxidativní poškození nervových buněk, které může být spojováno s oxidativním stresem. Přechodnou nebo slabou produkci ROS by bylo možné pozorovat jen s velmi vysokou koncentrací morfinu (1-4 mM).<sup>81</sup> Naopak koncentrace morfinu nižší než 200  $\mu$ M neprokázaly žádné stimulační, ale spíše inhibiční účinky na tvorbu ROS.<sup>83</sup> Ukázalo se, že nízké a extrémně nízké koncentrace morfinu mají neuroprotektivní účinky.<sup>84</sup> Přesný mechanismus neuroprotektce nízkými dávkami opioidů není ještě zcela objasněn.

### 5.1.3. Morfin a neuroAIDS

Zneužívání opioidů může zvýšit riziko neuroAIDS. NeuroAIDS zahrnuje spektrum klinických neurologických poruch způsobené virem HIV vyvolávající poškození nebo zánět v nervovém systému. Studie<sup>85</sup> ukazuje, že kombinace viru lidské imunodeficiency-Tat a morfinu způsobuje zvýšení ROS, oxidaci proteinů a snížení činnosti proteozomu. Tat způsobuje uvolňování cytokinů z mikroglíí (malé buňky v nervové tkáni účastníci se imunitních dějů v nervové soustavě). Morfin tyto cytokiny snižuje, především TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) a interleukin-6. Cytokiny a ROS hrají důležitou roli v poškození nervových buněk a v dysfunkci spojené s neuroAIDS.<sup>86</sup> Bylo prokázáno, že používání nebo zneužívání morfinu může mít nepříznivý vliv na imunitní funkce.<sup>87</sup> Může vést k imunosupresi a ohrožit imunitní odpovědi na bakteriální infekce.<sup>88</sup> Morfin může měnit fagocytární<sup>89</sup> a chemotaktické<sup>90</sup> vlastnosti mikroglíí, ale také produkci volných radikálů v těchto buňkách<sup>91</sup>. Mikroglie jsou hlavní imunokompetentní buňky v mozkové tkáni. Pokud morfin potlačí imunitní odpověď mikroglíí, může být snížena obranyschopnost proti infekci v mozkové tkáni. Tak se může zvýšit riziko neurologických komplikací způsobených HIV a zhoršit průběh AIDS. Navíc Tat pomáhá morfinu tím, že zvyšuje dostupnost opioidních receptorů. Kombinace Tat a morfinu zvyšuje možnost škodlivého působení morfinu. Přesný mechanismus morfinem zprostředkované imunosuprese zatím není znám.

### 5.1.4 Morfinem vyvolaná apoptóza makrofágů

V jedné studii bylo dokázáno, že morfin způsobuje apoptózu makrofágů. Tento účinek morfinu byl spojen s produkcí superoxidového radikálu a oxidu dusnatého. Morfinem vyvolaná apoptóza makrofágů je zprostředkována TGF- $\beta$  (tumor growth factor- $\beta$ ).<sup>92</sup> Jak bylo uvedeno výše, fosfolipasa D aktivuje NADPH oxidasu, což vede k produkci superoxidového radikálu. Systém NADH/NADPH oxidasa je významným zdrojem  $O_2^{\cdot-}$ . Jeho hromadění může vyvolat různými způsoby, včetně zvýšení aktivace xantinoxidasy, autooxidaci NADH a inaktivaci SOD.<sup>93</sup> DPI (diphenyleneiodonium chloride) je inhibitor NADPH oxidasy a ochraňuje makrofágy před proapoptickým účinkem morfinu. Stejně jako BAPTA (cytosolový chelator  $Ca^{2+}$ ) inhibuje morfinem vyvolanou produkci  $O_2^{\cdot-}$  v makrofágu. Apoptóze makrofágů vyvolané morfinem lze zabránit i podáním anti-TGF- $\beta$  protilátky, která zablokuje produkci NO a  $O_2^{\cdot-}$ .<sup>92</sup>

## 5.2. Met-enkefalin a oxidativní stres

Opioidní peptidy fungují jako modulátory ROS v makrofázích myši a lidských neutrofilech. Sobočanec a kol. zkoumali hypotézu, zda Met-enkefalin vytváří ROS změnou aktivity antioxidantních enzymů.<sup>94</sup> Výsledky ukázaly, že zvýšená citlivost červených krvinek na oxidativní stres způsobená opioidními peptidy vzniká v důsledku zvýšené aktivity SOD následované poklesem aktivity GPx, což by mohlo vést k poškození buněk hromaděním  $H_2O_2$ . Dále bylo zjištěno, že účinek Met-enkefalinu na peroxidaci lipidů je závislý na věku i pohlaví. Met-enkefalin stimuluje peroxidaci lipidů



u mladších myší obou pohlaví a potlačuje lipoperoxidaci pouze u starších myší samčího pohlaví.

Citlivost buněk na účinky volných radikálů zřejmě závisí na vztahu mezi SOD/CAT + GPx. Poměr SOD/CAT + GPx je významným ukazatelem schopnosti tkáně vyrovnat se s oxidativním stresem. Bylo dokázáno, že tento poměr je také závislý na věku. Mladé myši obou pohlaví měly nejnižší poměr SOD/CAT + GPx reflektující vysokou odolnost proti oxidativnímu poškození, a naopak stárnoucí myši vykazovaly nejvyšší citlivost na oxidativní stres. Věkem zvýšená aktivita antioxidantních enzymů může být pokusem organismu vyrovnat sníženou schopnost buněk vypořádat se s oxidativním stresem, o čemž svědčí nárůst poměru SOD/CAT + GPx u starších myší obou pohlaví.<sup>95</sup> Při podání Met-enkefalinu mladým myším obou pohlaví došlo ke zvýšení poměru SOD/CAT + GPx, což naznačuje, že opioidní peptidy zvyšují citlivost buněk na oxidativní stres. Daný poměr je důsledkem zvýšené aktivity SOD následované poklesem GPx. Met-enkefalin současně neovlivňuje činnost CAT. Přidružené hromadění H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vyvolávající poškození buněk může tak být připsáno opioidním receptorům.<sup>94</sup>

### 5.3. Heroinem vyvolaný oxidativní stres

Heroin je derivát morfinu. Je to diacetylmorfin. Touto diacetylací se heroin stává lépe rozpustným v tucích a proniká do CNS rychleji než morfin. Rychlé zvýšení koncentrace v CNS je zřejmě rozhodující pro vysoké nebezpečí vzniku závislosti.<sup>7</sup>

Byly studovány účinky heroinu podané intraperitoneálně myším. Po podání heroinu se ukázalo, že došlo ke snížení celkové antioxidantní aktivity (SOD, GSHPx a katalázy), zvýšené produkci ROS v bílých krvinkách, zvýšenému oxidativnímu poškození proteinů a lipidů v mozku a játrech, nikoli však v srdci (tbl. 2).

Potvrdilo se také, že exogenní antioxidanty mohou zabránit oxidativnímu poškození a zmírnit abstinenci příznaky.<sup>96</sup> Heroin je schopen vyvolat oxidativní poškození nervových buněk a neurodegeneraci. Vysoké dávky kyseliny L-askorbové podané perorálně mohou zlepšit abstinenci příznaky. Oxidativní poškození může být důležitým patologickým faktorem v závislosti na heroinu a antioxidanty mohou být užitečné látky, které zmírní abstinenci příznaky. Kyselina močová, kyselina L-askorbová, quercetin jsou antioxidanty používané při některých degenerativních onemocněních.<sup>97</sup> Heroin může stejně jako morfin stimulovat tvorbu superoxidového radikálu v mezangiálních buňkách glomerulu v závislosti na dávce.<sup>98</sup> ROS tedy hraje roli v poškození mezangiálních buněk u osob závislých na opioidech. Jediné podání heroinu zvýší množství dopaminu, což opět vede k produkci ROS. Kromě toho heroin sám může být metabolizován na sloučeniny typu volných radikálů.<sup>96, 99</sup>

**Tbl. 2 Souhrn důkazů prokazující oxidativní stres vyvolaný opioidy (upraveno podle 100)**

<b>Látka</b>	<b>Biologický model</b>	<b>Mechanismus</b>	<b>Dávka/aplikace</b>
<b>Morfin</b>	<i>In vivo</i> : králík; mozková a míšní tkáň	↑peroxidace lipidů ↓GSH ↓nenasycených mastných kyselin	6 mg/kg, intraspinálně
<b>Morfin</b>	<i>In vivo</i> : potkan; mozková tkáň	↓GSH	jednotlivá dávka 3, 6 nebo 12 mg/kg, intraperitoneálně
<b>Heroin</b>	<i>In vivo</i> : myš; mozková tkáň	↓SOD ↓CAT ↓GSHPx ↑oxidativního poškození DNA, lipidů	intraperitoneálně
<b>Heroin</b>	<i>In vivo</i> : myš; mozková tkáň	↓SOD ↓CAT ↓GSHPx ↑oxidace proteinů, DNA	intraperitoneálně

GSH = glutathion, SOD = superoxiddismutasa, CAT = katalasa, GSHPx = glutathionperoxidasa.

#### 5.4. Ochranný účinek endomorfínů proti oxidativnímu poškození

Řada neurodegenerativních onemocnění je spojována s oxidativním stresem (Parkinsonova, Alzheimerova choroba). Mozková tkáň je velmi citlivá na oxidativní poškození, neboť je zde vysoká spotřeba kyslíku, bohatý obsah lipidů a nízká hladina antioxidačních enzymů. ROS rychle oxiduje buněčné lipidy, což má za následek vznik mnohých produktů lipoperoxidace v nervových buňkách. Oxidačně modifikované lipidy jsou schopné reagovat s buněčnými a subcelulárními membránami a vést k neuronální buněčné smrti.

LDL (lipoprotein o nízké hustotě), který je přítomný v mozkové tkáni, je jedním z cílů peroxidace ROS. Oxidovaný LDL má cytotoxické účinky na neurony a podílí se na jejich degeneraci.<sup>101</sup> Zvýšená hladina ROS a iontů přechodných kovů ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ), které se podílejí na oxidaci LDL, jsou přítomny u neurodegenerativních chorob.

Nedávné studie<sup>102</sup> ukazují, že endogenní peptidy Endomorfín-1 a Endomorfín-2 mají schopnost eliminovat volné radikály, snižovat oxidativní poškození DNA, proteinů a peroxidaci lipidů vyvolanou ROS v mozkové tkáni. Potlačení oxidace LDL pomocí antioxidantů může být velmi účinné v prevenci a léčbě neurodegenerativních chorob.

Nevýhodou mnoha antioxidantů je jejich snížená průchodnost hematoencefalickou bariérou. Přítomnost látek s antioxidačními účinky v mozkové tkáni je tedy velmi významná. Využití neuroprotektivní aktivity endomorfínů by mohlo přinést pokrok v léčbě neurodegenerativních chorob.<sup>103</sup>

## 6. Závěr

Opioidy jsou běžně používaná analgetika. Jejich účinku je hlavně využíváno při silných akutních či chronických bolestech po úrazu, chirurgickém zákroku, nádorových bolestech, kde jsou jako analgetika nenahraditelné. Bohužel jejich použití má i řadu nevýhod. Jejich analgetický účinek zastiňují nežádoucí účinky, rozvoj tolerance a závislosti. Opioidy se také podílejí na tvorbě volných radikálů a reaktivních forem kyslíku, což může vést k oxidativnímu stresu. Volné radikály a reaktivní formy kyslíku hrají důležitou roli ve zdraví člověka. V organismu jsou neutralizovány antioxidačním systémem. Při snížené aktivitě těchto antioxidantů, dochází k nadměrné tvorbě volných radikálů, které pak mohou způsobit poškození důležitých buněčných komponent - proteinů, lipidů, DNA, což vede k řadě kardiovaskulárních, neurodegenerativních onemocnění, ateroskleróze, rakovině či stárnutí organismu. Opioidy mohou snižovat aktivitu významných antioxidačních enzymů (superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa), a podílet se na zvyšování množství volných radikálů v organismu. Stávají se tak nedílnou součástí procesu zvaný oxidativní stres, který vede ke zvýšení peroxidace lipidů, nenasycených mastných kyselin, oxidaci proteinů a poškození DNA.

## Seznam literatury

- 1** Kalant H.: Opium revisited: A brief review of its nature, composition, non-medical use and relative risks. *Addiction* (1997), 92(3), 267–277.
- 2** Lin Lu: Drug abuse in China: past, present and future. *Cell. Mol. Neurobiol.* (2008) 28, 479–490
- 3** Klockgether-Radke A. P.: F. W. Serturmer and the discovery of morphine. 200 years of pain therapy with opioids. *Anesthesiologie* 2002, 37(5): 244-249
- 4** Martin W. R.: History of development of mixed opioid agonists, partial agonists and antagonists. *Br. J. clin. Pharmac.* (1979), 7, 273S-279S
- 5** Brownstein M. J.: A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1993), 90, 5391-5393
- 6** Nelson S. L.: Opioids, Goldgrank's Toxicologic Emergencies, 8th edition (2006) 590-607 ISBN: 978-1-60119-784-9
- 7** Lüllman H., Mohr K., Wehling M.: Opiáty/Opioidy, *Farmakologie a toxikologie* (2004), 15. překlad, 321-336, ISBN: 80-247-0836-1
- 8** Gein S.V., Baeva T.A.: Endogenous opioid peptides in regulation of innate immunity cell functions, *Biochemistry* (2011), 76 (3), 309 – 319
- 9** Bodnar R.J.: Endogenous opiates and behavior: 2009, *Peptides* (2010), 31, 2325-2359
- 10** Gharagozlou P., Modanlou S., Clark D.J., Lameh J.: Characterization of endogenous opioid peptides at mu, delta and kappa opioid receptors, *Proc. West. Pharmacol. Soc.* (2006) 49, 109-113
- 11** Koneru A., Satyanarayana S., Rizwan S.: Current knowledge and future trends of endogenous opioids: their physiological role and receptors, *Pharmacologyonline* (2010), 1, 780-788
- 12** Horvath G.: Endomorphin-1 and Endomorphin-2: Pharmacology of the selective endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonists, *Pharmacology & Therapeutics* (2000), 88, 437-463
- 13** Trescot A.M., Datta S., Lee M., Hansen H.: Opioid pharmacology, *Pain Physician Journal* (2008), Opioid Special Issue: 11, S133-S153
- 14** Law P.Y., Loh H.H.: Regulation of opioid receptor activities, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* (1999), 289, 607-624

- 15** Wittert, G., Hope, P., Pyle, D.: Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1996), 218, 877-881
- 16** Waldhoer M., Bartlett S.E., Whistler J.L., Opioid Receptors, *Annual Review of Biochemistry* (2004), 73 (1), 953-990
- 17** Meis S.: Nociceptin/orphanin FQ: Actions within the brain, *Neuroscientist* (2003), 9, 158–168.
- 18** Hayashi T., Tsung-Ping S.:  $\sigma_1$ - receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders, *CNS Drugs* (2004), 18 (5), 269-284
- 19** Kobilka B.K.: G-protein coupled receptor structure and activation, *Biochimica et Biophysica Acta* (2007), 1768 (4), 794–807
- 20** Hermans E.: Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors, *Pharmacology & Therapeutics* (2003), 99, 25-44
- 21** Huster. D.: Integral membrane proteins – G-protein-coupled receptors, Universität Leipzig, Institut für Medizinische Physik und Biophysik, dostupné on-line: <http://www.uni-leipzig.de/~biophys/cms/index.php?id=231>
- 22** Crain S. M., Shen K. F.: Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled, GM1 ganglioside-regulated opioid receptor functions, *Trends in Pharmacological Sciences* (1998), 19, 358–365
- 23** Barry U., Zuo Z.: Opioids: Old drugs for potential new applications, *Current Pharmaceutical Design* (2005), 11, 1343-1350
- 24** Snijdelara G.D., Dirksenb R., Slappendelb R., Crula J. P. B.: Substance P, *European Journal of Pain* (2000), 4, 121–135
- 25** Gregorian R. S., Gasik A., Kwong J. W., Voeller S., Kavanagh S.: Importance of side effects in opioid treatment: a trade-off analysis with patients and physicians, *The Journal of Pain* (2010), 11(11), 1095-1108
- 26** Berger J. M.: Opioids in anesthesia, *Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain* (2005) 24, 108-119
- 27** Christie M. J.: Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction, *British Journal of Pharmacology* (2008), 154, 384–396
- 28** Inturrisi CH. E.: Clinical pharmacology of opioids for pain, *The Clinical Journal of Pain* (2002), 18, S3-S13

- 29** Pasternak G. W.: When it comes to opiates, just say NO, *The Journal of Clinical Investigation* (2007), 117(11), 3185-3187
- 30** Trujillo, K.A., Akil, H.: Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor anagonist MK-801. *Science* (1991), 251, 85–87
- 31** Andrews A. M., Kantor M. A.: Oxidative stress increase in overweight individuals following an exercise test, *Military medicine* (2010), 175(12), 1014-1018
- 32** Chaitanya K. V., Pathan A. A., Mazumdar S. S., Chakravarthi G. P.: Role of oxidative stress in human health: an overview, *The Journal of Pharmacy Research* (2010), 3(6), 1330-1333
- 33** Sagara Y., DArgusch R., Chambers D, Davis J., Schubert D., Maher P.: Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress, *Free Radical Biology & Medicine* (1998), 24(9), 1375–1389
- 34** Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: *Free radicals in biology and medicine* (2007), 4<sup>th</sup> edition, pp 187-188, ISBN: 978-0-19-856868-1
- 35** Adly A. A.: Oxidative stress and disease: an updated review, *Research Journal of Immunology* (2010), 3(2), 129-145
- 36** Sayre L. M., Perry G., Smith M. A.: Oxidative stress and neurotoxicity, *Chemical Research in Toxicology* (2008), 21(1), 172-188
- 37** Onyango G. I.: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease, *Neurochemical Research* (2008), 33(3), 589-597
- 38** Yudoh K., Trieu N., Nakamura H., Hongo-Masuko K., Kato T., Nishioka K.: Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function, *Arthritis Research & Therapy* (2005), 7, 380-391
- 39** Hayden R. M., Tyagi C. S.: Neural redox stress and remodeling in metabolit syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic neuropathy, *Medical Science Monitor* (2004), 10(12), 291-307
- 40** Tomic M., Ott J., Barral S., Bovet P., Deppen P., Gheorghita F., Matthey L. M., Parnas J., Preisig M., Saraga M., Solida A., Timm S., Wang A. G., Werge T., Cuénod M., Quang Do K.: Schizophrenia and oxidative stress: glutamate cysteine ligase modifier as a susceptibility gene, *The American Journal of Human Genetics* (2006), 79(3), 586-592
- 41** Jensen S. J. K.: Oxidative stress and free radicals, *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 2003, 387-392

- 42** Bergendi L., Beneš L., Ďuračková Z, Ferenčík M.: Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sciences*, (1999), 65(18/19), 1865-1874
- 43** Aruoma O. I.: Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *Journal of the American Oil Chemists' Society* (1998), 75(2), 199-212
- 44** Rahman K.: Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors, *Clinical Interventions in Aging* (2007), 2(2), 219–236
- 45** Buonocore G., Perrone S., Tataranno L. M.: Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species, *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* (2010), 15, 186-190
- 46** Martínez-Cayuela M.: Oxygen free radicals and human disease, *Biochemie* (1995), 77, 147-161
- 47** Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A.: Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint disease, *Joint Bone Spine* (2007), 74, 324-329
- 48** Keher J. P., Robertson J. D., Smith C. V.: Free radicals and reactive oxygen species, *Comprehensive toxicology*, 2<sup>nd</sup> edition, (2010), Vol. 1, pp 277-307, ISBN: 978-0-08-046868-6
- 49** Gollmer A., Arnbjerg J., Blaikie F. H., Pedersen B. W., Breitenbach T., Daasbjerg K., Glasius M., Ogilby P. R.: Singlet oxygen sensor green: photochemical behavior in solution and in a mammalian cell, *Photochemistry and Photobiology* (2011), 87, 671–679
- 50** Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: Singlet oxygen, *Free radicals in biology and medicine* (2007), 4<sup>th</sup> edition, pp 69-74, ISBN: 978-0-19-856868-1
- 51** Olesen J.: The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache, *Pharmacology & Therapeutics* (2008), 120, 157–171
- 52** Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiological Reviews* (2007), 87(1), 315-424
- 53** Winterbourn C. C.: Biological reactivity and biomarkers of the neutroliil oxidant, hypochlorous acid, *Toxicology* (2002), 181–182, pp 223–227
- 54** Kumar S. V., Saritha G., Fareedullah M.: Role of antioxidants and oxidative stress in cardiovascular disease, *Annals of Biological Research* (2010), 1(3), 158-173
- 55** Sies H.: Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants, *Experimental Physiology* (1997), 82, 291-295
- 56** Pokorny J. Yanishlieva N., Gordon M.: Antioxidants in food – practical applications (2001), ISBN: 978-1-85573-463-0, pp 42-51

- 57** Nordberg J., Arnér E. S. J.: Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free radical biology & medicine* (2011), 31(11), 1287–1312
- 58** Dictionary of food science and technology (2nd Edition) 2009, edited by International Food Information Service, pp. ISBN: 978-1-4051-8740-4
- 59** Stahl W., Sies H.: Antioxidant activity of carotenoids, *Molecular Aspects of Medicine* (2003), 24, 345–351
- 60** Vertuani S., Angusti A., Manfredini S.: The Antioxidants and pro-antioxidants network: an overview, *Current Pharmaceutical Design* (2004), 10, 1677-1694
- 61** Kumar A., Kaur H., Devi P., Mohan V.: Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome, *Pharmacology & Therapeutics* (2009), 124, 259–268
- 62** Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: Antioxidant defence enzymes: the glutathion peroxide family, *Free radicals in biology and medicine* (2007), 4<sup>th</sup> edition, pp 110-113, ISBN: 978-0-19-856868-1
- 63** Zhang Y., Chen Q., Long-Chuan Y.: Morphine: a protective or destructive role in neurons? *The Neuroscientist* (2008), 14(6), 561-570
- 64** Özmen I., Naziroglu M., Alici H. Ahmet, Fikrettin S., Mustafa C., Ibrahim E.: Spinal morphine administration reduces the fatty acid contents in spinal cord and brain by increasing oxidative stress, *Neurochemical Research* (2007), 32(1), 19-25
- 65** Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: Mechanisms of damage to cellular targets by oxidative stress: lipid peroxidation, *Free Radicals in Biology and Medicine* (2007), 4<sup>th</sup> edition, pp 236-242, ISBN: 978-0-19-856868-1
- 66** Halliwell B.: Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment, *Drugs & Aging* (2001), 18 (9), 685-716
- 67** Guzman C. D., Vazquez E. I., Brizuela N. O., Alvarez R. G., Mejia B. G., Garcia E. H.: Assessment of oxidative damage induced by acute doses of morphine sulfate in postnatal and adult rat brain, *Neurochemical Research* (2006), 31(4), 549-554
- 68** Chiara D. G., Imperato A.: Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1988), 85(14), 5274-5278
- 69** Bello D. G. M., Masini E., Ioannides C., Ndisang F.J., Raspanti S., Sacchi T. B., Mannaioni F.P.: Histamine release from rat mast cells induced by the metabolit activation of drugs of abuse into free radicals, *Inflammation Research* (1998), 47, 122-130



- 70 Zhang Y. T., Zheng Q. S., Pan J., Zheng R. L.: Oxidative damage of biomolecules in mouse liver induced by morphine and protected by antioxidants, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* (2004), 95, 53–58
- 71 Wang J., Charboneau R., Balasubramanian S., Barke R.A., Loh H. H., Roy S.: Morphine modulates lymph node-derived T lymphocyte function: role of caspase-3, -8, and nitric oxide, *Journal of Leukocyte Biology* (2001), 70, 527-536
- 72 Payabvash S., Beheshtian A., Salmasi A. H., Kiumehr S., Ghahremani H. M., Tavangar M. S., Sabzevari O., Dehpour R. A.: Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver, *Life Sciences* (2006), 79, 972–980
- 73 Czaja M. J.: Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress, *Antioxidants & Redox Signaling* (2002), 4(5), 759-767
- 74 Guicciardi M. E., Gores G. J.: Bile acid-mediated hepatocyte apoptosis and cholestatic liver disease, *Digestive and Liver Disease* (2002), 34(6), 387-392
- 75 Ljubuncic P., Tanne Z., Bomzon A.: Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease, *Gut* (2000), 47(5), 710-716
- 76 Rust Ch., Gores G. J.: Apoptosis and liver disease, *American Journal of Medicine* (2000), 108(7), 567-574
- 77 Lin S. H., Lee Y. M., Chang H. Y., Cheng Y. W., Yen M. H.: Effects of naltrexone on lipopolysaccharide-induced sepsis in rats, *Journal of biomedical science* (2005), 12(2), 431-440
- 78 Sokol R. J., Straka S. M., Dahl R., Devereaux M. W., Yerushalmi B., Gumprich E., Elkins N., Everson G.: Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids, *Pediatric Research* (2001), 49(4), 519-531
- 79 Payabvash S., Kiumehr S., Nezami B. G., Zandieh A., Anvari P., Tavangar S. M., Dehpour R. A.: Endogenous opioids modulate hepatocyte apoptosis in a rat model of chronic cholestasis: the role of oxidative stress, *Liver International* (2007), 27(4), 538-547
- 80 Kannan K., Jain S. K.: Oxidative stress and apoptosis, *Pathophysiology* (2000), 7(27), 153-163
- 81 Koch T., Seifert A., Wu D. F., Rankovic M., Kraus J., Börner C., Brandenburg L. O., Schröder H., Höllt V.:  $\mu$ -opioid receptor-stimulated synthesis of reactive oxygen species is mediated via phospholipase D2, *Journal of Neurochemistry* (2009), 110(4), 1288-1296

- 82 Koch T., Wu d. F., Yang L. Q., Brandenburg L. O., Höllt V.: Role of phospholipase D2 in the agonist-induced and constitutive endocytosis of G-protein coupled receptors, *Journal of Neurochemistry* (2006), 97(2), 365–372
- 83 Lin X., Li Q., Wang Y. J., Ju Y. W., Chi Z. Q., Wang M. W., Liu J. G.: Morphine inhibits doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and nuclear factor  $\kappa$ B transcriptional activation in neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Biochemical Journal* (2007), 406(2), 215-221
- 84 Qian L., Tan K. S., Wei S. J., Wu M. H., Xu Z., Wilson B., Lu R. B., Hong s. J., Flood M. P.: Microglia-mediated neurotoxicity is inhibited by morphine through an opioid receptor-independent reduction of NADPH oxidase activity, *The Journal of Immunology* (2007), 179, 1198-1209
- 85 Turchan-Cholewo J., Dimayuga F. O., Gupta S., Keller J. N., Knapp P. E., Hauser K. F., Bruce-Keller A. J.: Morphine and HIV-Tat increase microglial-free radical production and oxidative stress: possible role in cytokine regulation, *Journal of Chemistry* (2009), 108, 202-215
- 86 Streit J. W., Walter S. A., Pennell A. N.: Reactive microgliosis, *Progress in Neurobiology* (1999), 57, 563-581
- 87 McCarthy L., Wetzel M., Sliker J. K., Eisenstein T. K., Rogers T. J.: Opioids, opioid receptors, and the immune response, *Drug and Alcohol Dependence* (2001), 62, 111–123
- 88 Risdahl J. M., Khanna K. V., Peterson K. P., Molitor T. W.: Opiates and infection, *Journal of Neuroimmunology* (1998), 83, 4–18
- 89 Peterson P. K., Molitor T. W., Chao C. Ch.: The opioid–cytokine connection, *Journal of Neuroimmunology* (1998), 83, 63–69
- 90 Chao C. Ch., Hu S., Shark K. B., Sheng W. S., Gekker G., Peterson P. K.: Activation of *mu* opioid receptors inhibits microglial cell chemotaxis, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1997), 281(2), 998-1004
- 91 Hu S., Peterson P. K., Chao C. Ch.:  $\kappa$ -opioid modulation of human microglial cell superoxide anion generation, *Biochemical Pharmacology* (1998), 56, 285–288
- 92 Bhat R. S., Bhaskaran M., Mongia A., Hitosugi N., Singhal P. C.: Morphine-induced macrophage apoptosis: oxidative stress and strategies for modulation, *Journal of Leukocyte Biology* (2004), 75, 1131-1138

- 93** Rajgopalan S., Kurz S., Munzel T., Farpey M., Freeman B. A., Griendly K. K., Harrison D. G.: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone, *The Journal of Clinical Investigation* (1996), 97(8), 1916-1923
- 94** Sobočanec S., Balog T., Šverko V., Marotti T.: Met-enkephalin modulation of age-related changes in red cell antioxidant status, *Physiological Research* (2005), 54(1), 97-104
- 95** Husain K., Somani S. M : Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on hepatic and plasma antioxidant system in rat, *Journal Of Applied Toxicology* (1997), 17(3), 189–194
- 96** Pan J., Zhang Q., Zhang Y., Ouyang Z., Zheng Q., Zheng R.: Oxidative stress in heroin administered mice and natural antioxidants protection, *Life Sciences* (2005), 77, 183–193
- 97** Molina F. M., Sanchez-Reus I., Iglesias I., Benedi J.: Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (2003), 26(10), 1398-1402
- 98** Jaffe J. A., Kimmel I.P.: Chronic nephropathies of cocaine and heroin abuse: a critical review, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* (2006), 1(4), 655-667
- 99** Xu B., Wang Z., Li G., Li B., Lin H., Zheng R., Zheng Q.: Heroin-administered mice involved in oxidative stress and exogenous antioxidant-alleviated withdrawal syndrome, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* (2006), 99, 153–161
- 100** Cunha-Oliveira T., Rego A. C., Oliveira C. R.: Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs, *Brain Research Reviews* (2008), 58, 192-208
- 101** Sugawa M., Ikeda S., Kushima Y., Takashima Y., Cynshi O.: Oxidized low density lipoprotein caused CNS neuron cell death, *Brain Research* (1997), 761, 165–172
- 102** Lin X., Xue L. Y., Wang R., Zhao Q. Y., Chen Q.: Protective effects of endomorphins, endogenous opioid peptides in the brain, on human low density lipoprotein oxidation, *The FEBS Journal* (2006), 273, 1275-1284
- 103** Lin X., Yang D. J., Cai W. Q., Zhao Q. Y., Gao Y. F., Chen Q., Wang R.: Endomorphins, endogenous opioid peptides, provide antioxidant defense in the brain against free radical-induced damage, *Biochimica et Biophysica Acta* (2003), 1639, 195–202